

Aus der Frauenklinik
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

**Klinische Wertigkeit der Wachstumsfaktoren
Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und
Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1) und des
Bindungsproteins IGFBP-3 bei der
Untersuchung von Frauen mit erhöhtem
Brustkrebsrisiko**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr.med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Jana Maeffert
geb.18.09.1975 in Hamburg

Dekan: Prof. Dr. med. J. W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Lichtenegger
2. Prof. Dr. med. M. Kiechle
3. PD Dr. med. G. v. Minckwitz

Einreichungsdatum: 7.6.2002

Datum der Promotion: 11.02.2003

Inhaltsverzeichnis

1	<u>EINLEITUNG</u>	5
1.1	EINFÜHRUNG	5
1.2	FRAGESTELLUNG	6
1.2.1	UNTERSUCHUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN VEGF, IGF-1 UND IGFBP-3	6
1.2.2	VERGLEICH DER RISIKOMODELLE ZUR BERECHNUNG DES BRUSTKREBSRISIKOS NACH GAIL UND CHANG-CLAUDE	6
1.3	DAS MAMMAKARZINOM	7
1.4	FAMILIÄRER BRUSTKREBS	7
1.5	ERBLICHE MUTATIONEN	7
1.6	MODELLE ZUR BERECHNUNG DES INDIVIDUELLEN BRUSTKREBSRISIKOS	8
1.6.1	MODELL NACH GAIL	8
1.6.2	MODELL NACH CHANG-CLAUDE	9
1.7	PRÄKANZEROSEN	9
1.7.1	CARCINOMA DUCTALE IN SITU (DCIS)	10
1.7.2	CARCINOMA LOBULARE IN SITU (CLIS)	10
1.7.3	ATYPISCHE DUCTALE HYPERPLASIE (ADH)	10
1.8	BEHANDLUNG MIT TOREMIFEN (FARESTON®)	11
1.9	MAMMAKARZINOMFRÜHERKENNUNG FÜR PATIENTINNEN MIT ERHÖHTEM RISIKO	12
1.10	ANGIOGENESE	13
1.10.1	VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF)	16
1.10.2	BEDEUTUNG DER ANGIOGENESE FÜR DIAGNOSE UND PROGNOSE	18
1.10.3	ANTIANGIOGENETISCHE THERAPIE	19
1.11	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR 1 (IGF-1) UND DAS BINDUNGSPROTEIN IGFBP-3	20
1.12	ZIELSETZUNG DIESER STUDIE	25
2	<u>MATERIAL UND METHODIK</u>	26
2.1	PATIENTINNEN	26
2.1.1	ANAMNESTISCHE DATEN	28
2.1.2	RISIKOBERECHNUNG	32
2.1.3	TOREMIFENEINNAHME	32
2.2	METHODIK	32
2.2.1	GEWINNUNG DER PROBEN	32
2.2.2	THEORETISCHES PRINZIP DES SANDWICH-ELISA (ENZYMIMMUNOASSAY)	33
2.2.3	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON VEGF IM SERUM	35
2.2.4	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON IGF-1 IM SERUM	38
2.2.5	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON IGFBP-3 IM SERUM	40
2.2.6	AUSWERTUNG	42
2.3	STATISTIK	43
2.4	ERSTELLUNG DER DIAGRAMME	43
3	<u>ERGEBNISSE</u>	44
3.1	VERGLEICH DER SERUMKONZENTRATIONEN VON VEGF, IGF-1 UND IGFBP-3	44
3.1.1	VERGLEICH DER HAUPT- UND SUBGRUPPEN	44

Inhaltsverzeichnis	4
3.1.2 INTRAINDIVIDUELLE VERLÄUFE	44
3.1.3 AUSWIRKUNGEN DURCH TOREMIFEN (FARESTON®)	52
3.2 VERGLEICH DER VEGF-WERTE MIT DENEN EINES NORMALKOLLEKTIVES	55
3.3 VERGLEICH DER VEGF-WERTE MIT DENEN VON TUMORPATIENTINNEN	55
3.4 VERGLEICH DER RISIKOMODELLE NACH GAIL UND NACH CHANG-CLAUDE	56
<u>4 DISKUSSION</u>	<u>57</u>
4.1 FRAGESTELLUNG DER ARBEIT	57
4.2 METHODENKRITIK	59
4.2.1 BERECHNUNG DES ERHÖHTEN BRUSTKREBSRISIKO	59
4.2.2 MESSUNG VON VEGF, IGF-1 UND IGFBP-3	60
4.3 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	62
4.4 KANN EINE MESSUNG DER WACHSTUMSFAKTOREN IN DER KLINIK SINNVOLL EINGESETZT WERDEN?	64
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>65</u>
<u>6 ABKÜRZUNGEN</u>	<u>67</u>
<u>7 ANHANG</u>	<u>68</u>
7.1 DATENÜBERBLICK	68
7.1.1 SERUM-KONZENTRATIONEN VON VEGF, IGF-1 UND IGFBP-3	68
7.1.2 VERGLEICH DER GRUPPEN	70
7.1.3 VERGLEICH DER VEGF-WERTE MIT EINEM NORMALKOLLEKTIV	72
7.1.4 VERGLEICH DER VEGF-WERTE MIT TUMORPATIENTINNEN	72
7.2 ANAMNESTISCHE DATEN ZUM VERGLEICH DER RISIKOMODELLE	73
<u>8 LITERATUR</u>	<u>76</u>

1 Einleitung

1.1 Einführung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung der Frau. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, beträgt altersunabhängig für jede Frau 7-10%. Je später ein Tumor entdeckt wird, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass der Tumor in ein fortgeschrittenes Stadium eingetreten ist und sich damit die Prognose verschlechtert hat. Besonderes Augenmerk wird daher auf die Brustkrebsfrüherkennung gelegt und versucht, diese zu optimieren. Bisher stehen dabei bildgebende Verfahren wie Mammographie und Sonographie im Vordergrund.

Eine regelmäßige Kontrolle scheint besonders wichtig für Frauen zu sein, die ein erhöhtes Risiko für eine Brustkrebserkrankung aufweisen. Dies trifft zu für Familien, in denen das Mammakarzinom gehäuft und vor der Menopause auftritt und für Frauen, die bereits an einer Präkanzerose erkrankt sind.

Seit langem ist bekannt, dass die Neubildung von neuen Gefäßen, die Angiogenese, eine wesentliche Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Damit Gefäße im Tumorgewebe entstehen können, werden Wachstumsfaktoren ausgeschüttet. Dieser Prozess findet schon zu einem Zeitpunkt statt, an dem der Tumor noch klein ist und durch klassische Früherkennungsmaßnahmen nicht entdeckt werden kann.

Wachstumsfaktoren können im Blut quantitativ gemessen werden. Es wird beschrieben, dass sich bei Krebspatienten erhöhte Werte finden lassen. Damit die Messung eines Parameters in die Routine eingeführt werden kann, muss gewährleistet sein, dass er in der klinischen Situation stabil bleibt und zu aussagekräftigen Ergebnissen führt.

Um dies für die Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1, sowie des Bindungsproteins IGFBP-3, zu prüfen, wurden für diese Untersuchung die Serum-Konzentrationen eines klinischen Patientinnenkollektives gemessen und auf Unterschiede innerhalb gebildeter Subgruppen untersucht.

Damit eine Aussage über den Nutzen in der Routine gemacht werden kann, gibt es keine Ausschlusskriterien nach Faktoren, die die Serumwerte beeinflussen könnten und keine prospektive Zusammensetzung der Gruppen.

1.2 Fragestellung

1.2.1 Untersuchung der Wachstumsfaktoren VEGF, IGF-1 und IGFBP-3

Es wurden die Serumwerte der Wachstumsfaktoren VEGF, IGF-1 und des Bindungsproteins IGFBP-3 bei Frauen untersucht, die ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Brustkrebs besitzen und in einem Zeitraum von zwei Jahren in der Risikosprechstunde der Frauenklinik der Charité betreut wurden. Die Gruppe setzt sich zusammen aus gesunden Frauen, bei denen in der Familie ein oder mehrere Brustkrebsfälle auftraten und Frauen, die aufgrund einer Präkanzerose behandelt wurden, sowie Frauen, bei denen beide Risikomerkmale zutreffen. Zusätzlich wurden Patientinnen mit einem Mammakarzinom aus dem Patientengut der Frauenklinik als Kontrollgruppe untersucht.

Untersucht wurde, ob zwischen folgenden Gruppen Unterschiede der Serumwerte festgestellt werden können:

- zwischen den Hauptgruppen *familiäre Belastung*, *Präkanzerose* und *Mammakarzinom*,
- zwischen prä- und postmenopausalen Frauen,
- zwischen Frauen mit hohem und sehr hohem Risiko innerhalb der Gruppe der familiär belasteten Frauen
- zwischen Frauen mit und ohne zusätzlicher familiärer Belastung innerhalb der Gruppe der an Präkanzerose erkrankten Patientinnen

Außerdem wurde untersucht,

- ob sich in der Gruppe der an einer Präkanzerose erkrankten Frauen durch die Behandlung mit Antiöstrogenen eine Veränderung der Werte zeigen lässt,
- ob sich eine intraindividuelle Wertekonstanz über einen Zeitraum von mehreren Monaten findet und
- ob der Vergleich mit VEGF-Serum-Werten eines gesunden familiär unbelasteten Patientinnenkollektives den Nachweis einer Veränderung der VEGF-Serum-Konzentration liefert.

1.2.2 Vergleich der Risikomodelle zur Berechnung des Brustkrebsrisikos nach Gail und Chang-Claude

Als zusätzliche Fragestellung ergab sich der Vergleich zwischen den zwei verwendeten Modellen nach Gail [Gail (1989)] und Chang-Claude [Chang-Claude (1994)] zur Berechnung des individuellen relativen Risikos, an Brustkrebs zu erkranken.

1.3 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist mit etwa 45.000 Neuerkrankungen und 18.000 Todesfällen im Jahr die häufigste Krebserkrankung bei Frauen in Deutschland. Nach jahrzehntelangem Anstieg der Sterblichkeit ist in Deutschland seit Mitte der 90-Jahre ein deutlicher Rückgang zu verzeichnen. Diese Entwicklung ist auch in anderen Ländern zu beobachten, wobei der Zeitpunkt der Trendwende unterschiedlich ist. Die Inzidenz, also die Zahl der Neuerkrankungen, dagegen steigt, wobei dies auch mit einer Zunahme der diagnostizierten Fälle erklärt werden kann und nicht Ausdruck einer Zunahme des Erkrankungsrisikos sein muss [Becker (2001)].

Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, liegt für Frauen bei 7-10% [Seidmann (1986) in Baumann (1992)].

Bei fortgeschrittener Erkrankung liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei etwa 50%. Dabei hängt die Prognose vom Stadium nach der TNM-Klassifikation ab, das nach Tumorgröße, Lymphknotenbefall und Fernmetastasierung eingeteilt wird. Eine späte Diagnosestellung erhöht die Wahrscheinlichkeit des Eintritts in ein späteres Stadium.

Daher stellt insbesondere die Früherkennung den Gegenstand klinischer Forschung dar.

1.4 Familiärer Brustkrebs

Bei 15-20% der erkrankten Frauen ist auch eine Verwandte 1. Grades, also Mutter oder Schwester betroffen [Chang-Claude (1995)]. Dies lässt sich zum einen auf die hohe Inzidenz, zu einem Teil aber auch auf Vererbung zurückführen.

Ziel einer speziellen Risikosprechstunde ist es, Frauen mit erhöhtem Risiko aufgrund einer familiären Häufung zu charakterisieren, das individuelle Risiko abzuschätzen und ihnen eine besondere Vorsorge zukommen zu lassen, um ein beginnendes Tumorwachstum möglichst frühzeitig erkennen zu können.

1.5 Erbliche Mutationen

Etwa 5% der Brustkrebsfälle sind durch eine Mutation bedingt [Chang-Claude (1995)], bei Frauen unter 35 Jahre kann in etwa 10% eine Mutation gefunden werden [Langston (1996)].

Bei Mutation der autosomal dominanten Tumorsuppressorgene BRCA 1 auf Chromosom 17q21 und BRCA 2 auf Chromosom 13q12-13 ist das Erkrankungsrisiko stark erhöht. Trägerinnen der häufigeren BRCA 1-Mutation weisen ein Risiko bis zu

87% auf, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken [Chang-Claude (1994)]. Das Risiko, bis zum 50. Lebensjahr zu erkranken, liegt für diese Frauen bei 51% [Easton (1995) in Hampl (1997)]. Zu vermuten ist eine Mutation insbesondere, wenn in Familien gehäuft Brustkrebs vor dem 45. Lebensjahr und zusätzlich Ovarialkarzinome auftreten.

Der Nachweis einer Mutation gelingt durch direkte Gendiagnostik über Mutationsanalysen in den BRCA-1 und BRCA-2-Genen oder durch indirekte Diagnostik über Kopplungsanalyse in den betroffenen Familien [Kiechle (2001)].

Neben Mutationen des BRCA-1 und BRCA-2 gibt es weitere Gendefekte, die zu einem erhöhten Risiko für die Brustkrebsentstehung führen. Diese sind aber nur bei einem kleinen Teil der genetisch bedingten Tumoren nachweisbar und häufig Ausdruck einer generellen Disposition zur Krebsentwicklung [Chang-Claude (1995)].

1.6 Modelle zur Berechnung des individuellen Brustkrebsrisikos

Auch wenn eine Mutation nicht nachweisbar ist, haben Frauen mit betroffenen Verwandten ein statistisch höheres Risiko, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken.

Zur Abschätzung dieses individuellen Risikos werden folgende Modelle nach Gail und Chang-Claude verwendet.

1.6.1 Modell nach Gail

Das Modell zur Risikoabschätzung nach Gail wurde auf der Grundlage epidemiologischer Daten entwickelt, die im Rahmen des Breast Cancer Detection Demonstration Projekt (BCDDP) zwischen 1973 und 1980 multizentrisch erhoben wurden. Dabei wurde für die Entwicklung des Modells eine Case-Control-Studie mit 5.998 kaukasischen Frauen durchgeführt, die etwa jährlich eine Vorsorgeuntersuchung durchführen ließen.

Aus einer Vielzahl von unterschiedlichen Variablen wurden vier Faktoren ermittelt, für die eine Beeinflussung des individuellen Erkrankungsrisikos angenommen wird:

1. Menarchealter
2. Alter bei erster Geburt
3. Anzahl der an Brustkrebs erkrankten Verwandten 1. Grades (Mutter oder Schwester)
4. Anzahl der vorausgegangenen Brustbiopsien

Dabei ist das Risiko erhöht bei früher Menarche, hohem Alter bei erster Geburt bzw. Kinderlosigkeit, positiver Familienanamnese bezüglich Brustkrebs und häufigen Biopsien.

Errechnet werden kann so das individuelle relative Risiko im Vergleich zum altersspezifischen relativen Risiko, im Laufe des Lebens oder auch in den folgenden fünf Jahren, an Brustkrebs zu erkranken [Gail (1989)].

1.6.2 Modell nach Chang-Claude

Die Risikoabschätzung nach Chang-Claude ist ein Modell, mit dessen Hilfe sich nach Alter und Anzahl der erkrankten Verwandten ein relatives Risiko im Vergleich zur Normalbevölkerung ermitteln lässt.

Basis ist eine epidemiologische Studie, die Cancer and Steroid Hormone Study (CASH), die in den Vereinigten Staaten durchgeführt wurde und welche Tabellen liefert, aus denen das individuelle Risiko entnommen werden kann [Claus (1994)].

Für die genaue Angabe des Risikos müssen Verwandtheitsgrad der erkrankten Verwandten (1.Grad bezeichnet Mutter und Schwester, 2.Grad Großmutter, Tante, Cousine mütterlicher- bzw. väterlicherseits) und Erkrankungsalter bekannt sein.

Es lassen sich damit die Risiken für die Erkrankung bis zu einem bestimmten Lebensalter aus entsprechenden Tabellen entnehmen.

1.7 Präkanzerosen

Als Präkanzerosen werden präinvasive Veränderungen des Brustdrüsengewebes bezeichnet. Etwa 15-25% der diagnostizierten Präkanzerosen gehen nach einer Latenzzeit von mehreren Jahren in ein invasives Wachstum über. Die Diagnose einer Präkanzerose erhöht das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken, um ein 7-faches [Franceschi (1998)].

Aufgrund der häufigen Multizentrität des Mammakarzinoms ist auch die besondere Vorsorge bei Patientinnen mit behandelter Präkanzerose wichtig, um ein beginnendes Tumorwachstum an anderer Stelle möglichst frühzeitig zu erkennen.

Dabei werden die Präkanzerosen nach dem Gewebe, von dem sie ausgehen, in das Carcinoma ductale in situ (DCIS) und das Carcinoma lobulare in situ (CLIS) unterschieden. Ausserdem wird die Atypische ductale Hyperplasie (ADH) den Präkanzerosen zugerechnet.

1.7.1 Carcinoma ductale in situ (DCIS)

Das häufigere DCIS geht von den Milchgängen aus und überschreitet deren anatomische Grenzen zunächst nicht. Gehen Tumorzellen zugrunde, entstehen strahlenförmige, unregelmäßig begrenzte Mikroverkalkungen [Riede (1995)], die in 70-95% der durch Mammographie diagnostizierten Tumoren (50-60% der Fälle) vorkommen [Schmidt-Matthiesen (1982)].

Die Überlebenswahrscheinlichkeit beim DCIS beträgt bei adäquater Therapie, die je nach Index in brusterhaltender Operation mit Nachbestrahlung bzw. subkutaner Mastektomie mit nachfolgender Tamoxifenbehandlung besteht, bei 94-96% [Schmidt-Matthiesen (1982)].

Patientinnen mit einem DCIS haben gegenüber der Normalbevölkerung ein 4- bis 10-fach erhöhtes Risiko, an Brustkrebs zu erkranken [Wärnberg (2000)].

1.7.2 Carcinoma lobulare in situ (CLIS)

Das CLIS geht von den Azini der Lobuli aus und kommt in 60-80% der Fälle multizentrisch und in 18-69% der Fälle bilateral vor. Es ist klinisch und mammographisch schwer zu erkennen und daher häufig ein Zufallsbefund nach Biopsie. Das CLIS wird eher als Ausdruck einer Disposition zur malignen Entartung des Brustdrüsengewebes gesehen als die direkte Vorstufe eines invasiven Tumors [Franceschi (1998)]. So ist das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, für Frauen mit CLIS etwa 12-fach gegenüber der Normalbevölkerung erhöht [Frykberg (1999)].

Therapie ist die Exzision im Gesunden, die wegen der häufigen Multizentrität allerdings problematisch ist [Schmidt-Matthiesen (1982)].

1.7.3 Atypische ductale Hyperplasie (ADH)

Als weitere Präkanzerose gilt die ADH, die als proliferierende Mastopathie mit Zell- und Kernatypien bezeichnet wurde (Prechtel Grad 3). Im Gegensatz zum DCIS lassen sich in den Epithelproliferaten noch Drüsenepithelien von Myoepithelien unterscheiden.

Patientinnen mit ADH haben ein vier- bis fünffach erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung, an Brustkrebs zu erkranken [Riede (1995), Page (1985)], dies betrifft vor allem das prämenopausale Auftreten [Marshall (1997)].

1.8 Behandlung mit Toremifen (Fareston®)

Seit langem werden in der Behandlung des Mammakarzinoms Antiöstrogene eingesetzt. Für die adjuvante Therapie wird eine Sterblichkeitsreduktion um 17% angegeben [Becker (2001)].

Chemisch handelt es sich bei den Präparaten um substituierte Triphenyläthylabkömmlinge [Bruns (1994)].

Als klassischer Wirkungsmechanismus gilt dabei der kompetitive Antagonismus an den Östrogen-Rezeptoren der Tumorzellen [Pollak (1992)]. Es werden aber auch andere Angriffspunkte diskutiert. So lassen sich spezifische Bindungsstellen im Zytoplasma, die „antiestrogen binding sites“, finden, die sowohl in östrogenabhängigen als auch in östrogenunabhängigen Tumorzellen vorkommen [Sutherland (1980) in Bruns (1994)].

Zusätzlich wird eine hormonunabhängige zytotoxische Wirkung der Antiöstrogene beschrieben, deren Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist [Bruns (1994)].

Häufigstes Präparat zur Therapie des Mammakarzinoms ist das Tamoxifen, das neben der antiöstrogenen Wirkung aber auch eine deutliche östrogene Wirkung besitzt. In den letzten Jahren wurden daher neue Antiöstrogene mit schwächerer östrogener Wirkung entwickelt, unter ihnen das Toremifen, das zusätzlich eine deutliche zytotoxische Wirkung zeigt [Zaccheo (1986) in Bruns (1994)].

Die Verlängerung der Überlebenszeit durch adjuvante Gabe von Antiöstrogenen ist für Patientinnen mit hormonabhängigen Tumoren durch verschiedene Studien gesichert [Delozier (1986), Fisher (1986)].

Interessanterweise findet sich allerdings auch ein positiver Effekt bei der Behandlung östrogenunabhängiger Tumoren [Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (1992) in Friedl (1993)], der durch hormonunabhängige Wirkungsmechanismen erzielt werden muss.

Möglicher Erklärungsansatz ist dabei die Beeinflussung von Wachstumsfaktoren.

1.9 Mammakarzinomfrüherkennung für Patientinnen mit erhöhtem Risiko

Im Rahmen des Konsortiums *Hereditäres Mamma- und Ovarialkarzinom* der Deutschen Krebsgesellschaft wurde ein Früherkennungsprogramm für Frauen mit familiärer Belastung erarbeitet.

Es beinhaltet neben der regelmäßigen Selbstuntersuchung der Brust nach fachärztlicher Anleitung die Tastuntersuchung durch den betreuenden Facharzt in 3-monatigem Abstand und die sonographische Untersuchung der Brust und der Eierstöcke in 6-monatigem Abstand. Fakultativ kann der Tumormarker Ca-12-5 bestimmt werden. In 1-jährlichem Abstand wird vom 25.-65. Lebensjahr eine Kernspintomographie (MR) und ab dem 30. Lebensjahr eine Mammographie der Brust durchgeführt. Zusätzlich sollte eine Stuhlprobe auf okkultes Blut untersucht werden [Kiechle (2001)].

1.10 Angiogenese

Um die Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff zu gewährleisten, ist jedes Gewebe von kleinen Blutgefäßen, den Kapillaren, durchzogen. Da sich die auskleidenden Zellen, die Endothelzellen, unter physiologischen Umständen beim Erwachsenen kaum noch teilen, verändert sich dieses dichte Netz aus Gefäßen nur sehr wenig. Ausnahmen sind die Neubildung von Kapillaren während der Wundheilung, einer Schwangerschaft und während des Menstruationszyklus.

Diese Aussprossung von neuen Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet [Folkman (1996)].

Die dafür notwendige Teilung der Endothelzellen wird über ein komplexes System aus stimulierenden und inhibitorischen Faktoren reguliert.

Bei einigen Krankheitszuständen findet sich eine überschüssige Angiogenese. Dazu gehören beispielsweise rheumatoide Arthritis, diabetische Retinopathie, Psoriasis und Hämangiome [Heits (1998)].

Besonders bei der Tumorentstehung spielt die Angiogenese eine entscheidende Rolle, da erst mit dem Anschluss an das Gefäßsystem der Transport für Nährstoffe und die Möglichkeit zur Ausbreitung gewährleistet ist [Folkman (1995)]. Das Wachstum aller soliden Tumoren und deren Metastasierung ist von der ausreichenden Versorgung mit Blutgefäßen abhängig.

Hat ein Tumor eine Größe von 1-2 mm überschritten, kann er nicht mehr durch Diffusion versorgt werden. Er beginnt als parakrine Signale Wachstumsfaktoren auszuschütten, die zu den benachbarten Endothelzellen diffundieren und dort eine Veränderung des Zytoskeletts und eine Auflösung der Basalmembran bewirken. Diese proteolytische Zerstörung der Basalmembran erfolgt durch sezernierte Metalloproteasen und Plasminogen-Aktivatoren [Kroll (2000)]. Infolgedessen kommt es zu einem Austritt von Flüssigkeit und chemotaktischen Stoffen in das Gewebe. T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen werden angelockt und setzen weitere proangiogene Mediatoren frei [Heits (1998)]. Unter dem Einfluss dieser Wachstumsfaktoren teilen sich die Endothelzellen und wandern Richtung Tumor, dabei bilden sie Röhren. Diese neuen Tumorkapillaren enthalten mehr Endothelzellen als physiologische Kapillaren [Folkman und Shing (1992) in Herbstritt (1994)], die Permeabilität ist größer [Dvorak (1991) in Herbstritt (1994)]. Nach Ummantelung durch Perizyten und einer Ablagerung von extrazellulären Matrixkomponenten wie Elastin,

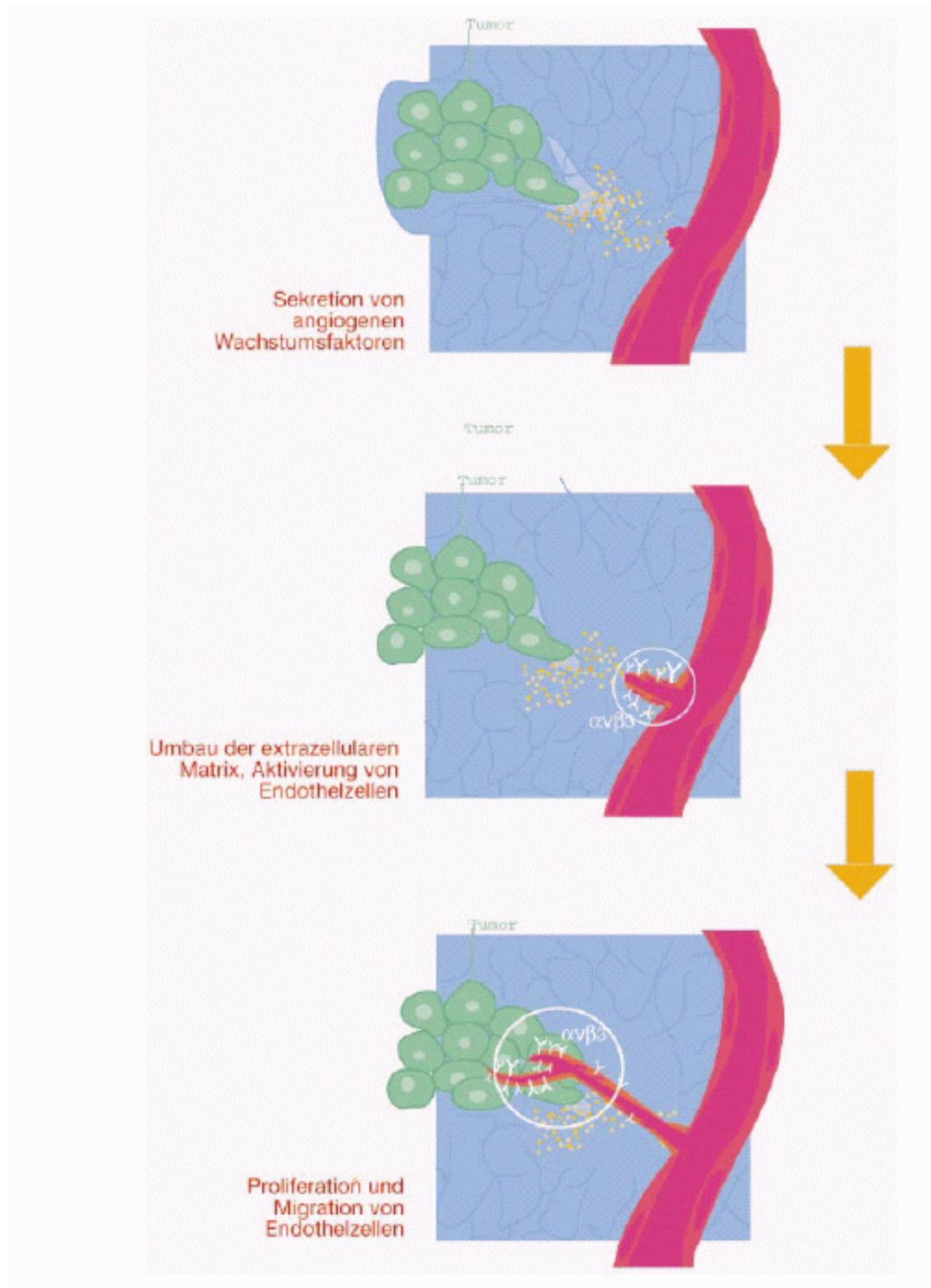
Kollagen und Fibrillin werden die Kapillaren in größere Gefäße umgewandelt und erhalten Anschluss an das bestehende Gefäßnetz [Kroll (2000)].

Damit es zu dieser Gefäßneubildung im Tumor kommt, müssen von den Zellen sowohl angiogenetische Faktoren ausgeschüttet werden, als auch antiangiogenetische Faktoren (vor allem Angiostatin und Endostatin) unterdrückt werden. Es kommt zum „angiogenic switch“ [Harris (1997), Locopo (1998)]. Auslösender Reiz für diesen Prozess ist vor allem eine Hypoxie und eine Hypoglykämie [Harris (1997)] des Gewebes [Fiedler (2001)].

Der Tumor geht mit dem Anschluss an das Gefäßsystem von einem avaskulären in ein vaskuläres Stadium über, es resultiert neben der Größenzunahme die Möglichkeit zur Metastasierung [Folkman (1992)], da die neu gebildeten Kapillaren durchlässige Basalmembranen besitzen, die die Penetration von Tumorzellen erleichtern [Harstrick (2000)].

Unter den mehr als 25 bekannten proangiogenetischen Peptiden [Locopo (1998)] ist das wohl potenteste Mitogen der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, auch als vaskulärer Permeabilitätsfaktor (VPF) bezeichnet.

Abb. 1: Schritte der Tumorangiogenese [Harstrick (2000)]



1.10.1 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF wird von nahezu allen soliden Tumoren gebildet und sezerniert. Er wirkt endothelspezifisch und nimmt damit eine besondere Stellung unter den proangiogenetischen Faktoren ein [Marmé (1998)].

1.10.1.1 Physiologie

Zu der Familie der vaskulären endothelialen Wachstumsfaktoren gehören neben dem VEGF-A die verwandten Faktoren VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E und der placenta growth factor (PlGF), über deren Funktion und Bedeutung noch wenig bekannt ist [Kroll (2000)]. Im folgenden ist mit dem Terminus VEGF das VEGF-A gemeint.

Das humane VEGF kommt in mindestens fünf Isoformen [Locopo (1998)] vor. Im Serum findet sich vor allem das VEGF₁₆₅ [Houck (1991)], ein homodimeres Glykoprotein mit einer molekularen Masse zwischen 39 und 45 kDa [Claffey (1995)]. Für die Signalübermittlung wurden zwei Rezeptoren identifiziert, der VEGF-Rezeptor 1 (FLT-1) und der VEGF-Rezeptor 2 (FLK-1[KDR]). Beide gehören zur Familie der Rezeptor-Tyrosinkinasen, bei Aktivierung resultiert eine Erhöhung der zytosolischen Calciumionenkonzentration [Heits (1998)].

Die Expression dieser Rezeptoren findet sich vor allem an proliferierenden Endothelzellen, wie sie im Bereich eines Tumors vorkommen, oder in dessen unmittelbarer Nähe [Fiedler (2001)]. Diese selektive Expression der Rezeptoren wird vor allem stimuliert durch VEGF selbst und dem basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) [Marmé (1998)]. Außerdem kommt es zu verstärkter Expression bei Hypoxie [Kroll (2000)]. Eine Aktivierung der Rezeptoren bewirkt eine Chemotaxis auf Endothelzellen und Monozyten und fördert deren Proliferation und Migration [Heits (1998)]. Außerdem wird die Gefäßpermeabilität erhöht, die Expression von Proteasen stimuliert und die Freisetzung von Stickstoffmonoxid gesteigert [Kroll (2000)].

1.10.1.2 Regulation des VEGF-Spiegels

Die VEGF-Synthese wird über verschiedene Mediatoren wie Steroidhormone, Zytokine und Tumorpromotoren mit hemmenden oder fördernden Effekten reguliert [Heits (1998)]. Zu den fördernden Faktoren gehören der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), der basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), der Tumor Necrosis Factor α (TNF- α), der Transforming Growth Factor α und β (TGF α , TGF β) sowie die Zytokine

Interleukin 1 β und Interleukin 6 [Marmé (1998)]. Den größten Einfluss hat das lokale Sauerstoff- und Glucoseangebot. Bei Gewebehypoxie und Glucosemangel wird vermehrt VEGF gebildet [Shweiki (1995)].

Als Mechanismus dafür konnte neben verstärkter VEGF-Expression eine Stabilisierung der VEGF-mRNA bei verringertem Sauerstoff-Partialdruck im Gewebe identifiziert werden [Marmé (1998)].

1.10.1.3 Bedeutung für die Tumorentstehung

Bei der Entstehung eines soliden Tumors spielt VEGF als wichtigstes Mitogen der Angiogenese eine entscheidende Rolle [Claffey (1996)].

Er kann in nahezu allen soliden Tumoren gefunden werden [Fiedler (2001)]. Durch Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit und Bildung von neuen Gefäßen werden Größenzunahme und Metastasierung ermöglicht [Heits (1998)].

Mehrere Studien an unterschiedlichen Tumorzelllinien (dazu gehören neben Brustkrebszellen auch Tumorzellen des Gastrointestinaltraktes, des ZNS, des Harntraktes und des Ovars) zeigen eine Erhöhung der Expression von VEGF-mRNA im malignen Gewebe [Yamamoto (1996)]. Besonders im hochmalignen, schnell proliferierenden Tumorgewebe [Brown (1995)] und dort vor allem in hypoxischen Arealen [Harris (1997)] ist die Expression deutlich erhöht. Es zeigt sich außerdem ein Zusammenhang mit bekannten Onkogenprodukten wie HER-2/neu und K-ras. Desweiteren ist die Expression von VEGF-mRNA bei Mutation des Tumorsuppressorgenes p53 gesteigert [Locopo (1998)]. Ist Tumorgewebe stark vaskularisiert, können höhere VEGF-Konzentrationen gegenüber schwach vaskularisierten Tumoren gemessen werden [Toi (1996)].

Im Tiermodell konnte bereits gezeigt werden, dass das Tumorwachstum durch eine Rezeptorblockade [Aiello (1995)] und durch die Gabe von Antikörpern [Kondo (1993)] gehemmt wird. Auch kann dadurch die Metastasierungsneigung gesenkt werden [Melnyk (1996) in Heits (1998)].

1.10.1.4 Beeinflussung durch Antiöstrogene

Es hat sich gezeigt, dass Östrogene und Progesteron die Freisetzung von VEGF in einigen Brustkrebszelllinien fördern [Heits (1998), Hyder (1998) in Locopo (1998)]. Es lässt sich also für VEGF eine Beeinflussbarkeit durch Antiöstrogene vermuten.

1.10.2 Bedeutung der Angiogenese für Diagnose und Prognose

Die Neubildung von Gefäßen gilt als wichtiger Prozess für die Entstehung eines malignen Tumors und den weiteren Verlauf der Krankheit.

Entscheidend ist dabei die Entwicklung eines Tumors vom avaskulären Stadium, das über einen sehr langen Zeitraum anhalten kann, zum vaskulären Stadium, in dem der Tumor beginnt, expansiv zu wachsen und letztendlich zu metastasieren.

Zur Beobachtung der Angiogenese im Tumorgewebe kann die Gefäßdichte histologisch gemessen werden. Dabei findet man Bereiche mit einer besonders hohen Dichte, den „hot spots“, in denen die Angiogenese ihren Anfang nimmt [Folkman (1994)]. Weidner (1992) beschreibt die Dichte der Gefäßbildung als einen prognostischen Marker bei Patientinnen mit Brustkrebs.

Für den Prozess der Angiogenese ist die Ausschüttung von VEGF entscheidend. Es findet sich eine positive Korrelation zwischen VEGF-Expression und der immuno-histochemisch gemessenen Gefäßdichte [Toi (1994)].

Von mehreren Autoren wird daher die Verwendung des VEGF als Parameter zur Diagnose, Prognose und Verlaufskontrolle vorgeschlagen. Die Messung von VEGF in Serum oder Plasma der Patientin könnte möglicherweise Hinweise auf die Entwicklung eines Tumors, auf seine Masse und auf seine Ausbreitung geben [Heits (1997)].

In verschiedenen Studien werden hohe Serum-VEGF-Konzentrationen mit prognostisch schlechten Parametern maligner Tumorerkrankungen assoziiert [Lee (2000)]. So wird eine Erhöhung der Serum-VEGF-Konzentration in Abhängigkeit von der Tumormasse [Heits (1997)] und der Geschwindigkeit des Tumorwachstums [Dirix (1996) in Lee (2000)] beschrieben.

Linderholm (1998) und Gasparini (1997) fanden eine Korrelation zwischen hohen VEGF-Konzentrationen und einer schlechteren Prognose der Erkrankung. Linderholm (1998) zeigt, dass ein erhöhter VEGF-Spiegel bei lymphknoten-negativen Mammakarzinompatientinnen mit einem kürzeren rezidivfreien Intervall und einer verringerten Überlebenszeit einhergeht.

1.10.3 Antiangiogenetische Therapie

Eine Beeinflussung der Angiogenese wird als Möglichkeit zur Behandlung einer malignen Tumorerkrankung beschrieben. Ein Vorteil dieses Therapieansatzes ist, dass eine Gefäßneubildung in gesundem Gewebe außer während des Menstruationszyklus und einer Schwangerschaft nicht vorkommt, und daher antiangiogenetische Medikamente normale Gefäße nicht schädigen [Folkman (1996)].

Zur Hemmung der Gefäßneubildung erscheinen drei Strategien erfolgsversprechend:

1. Inhibition und/oder Neutralisation angiogener Mediatoren wie VEGF,
2. Inhibition der Synthese und des Umbaus der Gefäßmembran und des Abbaus der extrazellulären Matrix,
3. Inhibition der Endothelzellproliferation und –migration [Harstrick (2000)].

Das VEGF/VEGF-Rezeptorsystem scheint als Ziel einer antiangiogenetischen Therapie besonders geeignet, da das Vorkommen der VEGF-Rezeptoren auf Gefäßendothelien beschränkt ist, die Tumoren durchziehen oder in deren unmittelbarer Nähe zu finden sind [Marmé (1998)].

VEGF kann durch lösliche VEGF-Rezeptoren neutralisiert werden, in dem durch die hochaffine Bindung der löslichen Rezeptoren eine Bindung des VEGF an die Rezeptoren der Endothelzellen verhindert wird. Außerdem kann die VEGF-Rezeptor-Tyrosinkinase durch einen spezifischen Inhibitor direkt gehemmt werden [Marmé (1998)].

Neben der Beeinflussung des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems gibt es als weitere Möglichkeit die direkte Inhibition der Angiogenese durch blockierende Substanzen wie Angiostatin, Endostatin und Thrombospondin-1/2 [Gasparini (1999)].

Experimentelle Studien zeigen, dass eine Blockade der VEGF-Aktivität einen Wachstumsstillstand von Tumoren hervorrufen kann [Goldman (1998), Luo (1998) in Kranz (1999)].

Es lässt sich allerdings von der alleinigen Behandlung mit Angiogenese-Inhibitoren keine schnelle Remission des Tumors erwarten. Hauptziel ist hierbei die Dauertherapie zur Verzögerung des Krankheitsprogresses.

Auch eine Kombination mit anderen Chemotherapeutika oder Bestrahlung ist vorstellbar, im Tiermodell wurden dabei bereits Erfolge erzielt [Folkman (1996)].

1.11 Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und das Bindungsprotein IGFBP-3

Der Insulin-like growth factor 1 wirkt als starkes Mitogen für normale und abnormale Zellen. Seine Aktivierung führt zu erhöhter Proliferationsneigung und verringerter Apoptoserate. Die Regulation der IGF-1-Konzentration wird in hohem Maße von seinen Bindungsproteinen beeinflusst.

1.11.1.1 Physiologie

Der Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Polypeptid mit einer Größe von 7 kDa, dessen Struktur Ähnlichkeiten mit dem Proinsulin aufweist [Rosen (1999)].

Die Wirkungsvermittlung findet an einem Rezeptor statt, der zu der Familie der Tyrosin-Kinasen gehört.

Der Großteil des zirkulierenden IGF-1 wird in der Leber produziert und sezerniert. Damit entspricht die Wirkungsweise einem endokrinen Hormon. Es findet sich allerdings auch eine lokale Produktion in vielen unterschiedlichen Geweben, dabei wird entweder dieselbe Zelle (autokrin) oder eine angrenzende Zelle beeinflusst (parakrin) [Zapf (1997)]. Diese lokale Produktion ist für eine normale Entwicklung ausreichend, wie Experimente an Mäusen mit fehlender IGF-1-Produktion der Leber gezeigt haben [Werner (2000)].

1.11.1.2 Regulation des IGF-1-Spiegels

Die Wirkung von IGF-1 an seinem spezifischen Rezeptor wird über ein komplexes Regulationssystem gesteuert. Dazu gehören neben dem, derselben Familie angehörenden, Liganden IGF-2 und den Rezeptoren IGF-1-R und IGF-2-R (einem Mannose-6-Phosphat-Rezeptor) noch verschiedene Bindungsproteine und Proteasen.

Stärkster Auslöser der Produktion in den Leberzellen, und damit für den Anstieg des Serumspiegels, ist die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse. Allerdings wird auch eine Beeinflussung durch Thyreoid- und andere Steroidhormone angenommen [Pollak (1992)]. Somit kann die IGF-1-Produktion durch zahlreiche physiologische oder pathologische endokrinologische Faktoren beeinflusst werden.

Entscheidend aber für die Wirkung des Serum-IGF-1 ist das Zusammenspiel mit seinen Bindungsproteinen.

Bekannt sind bisher sieben Proteine [Oh (1998)] , IGFBP-1 bis IGFBP-7, die in Serum und Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen vorkommen.

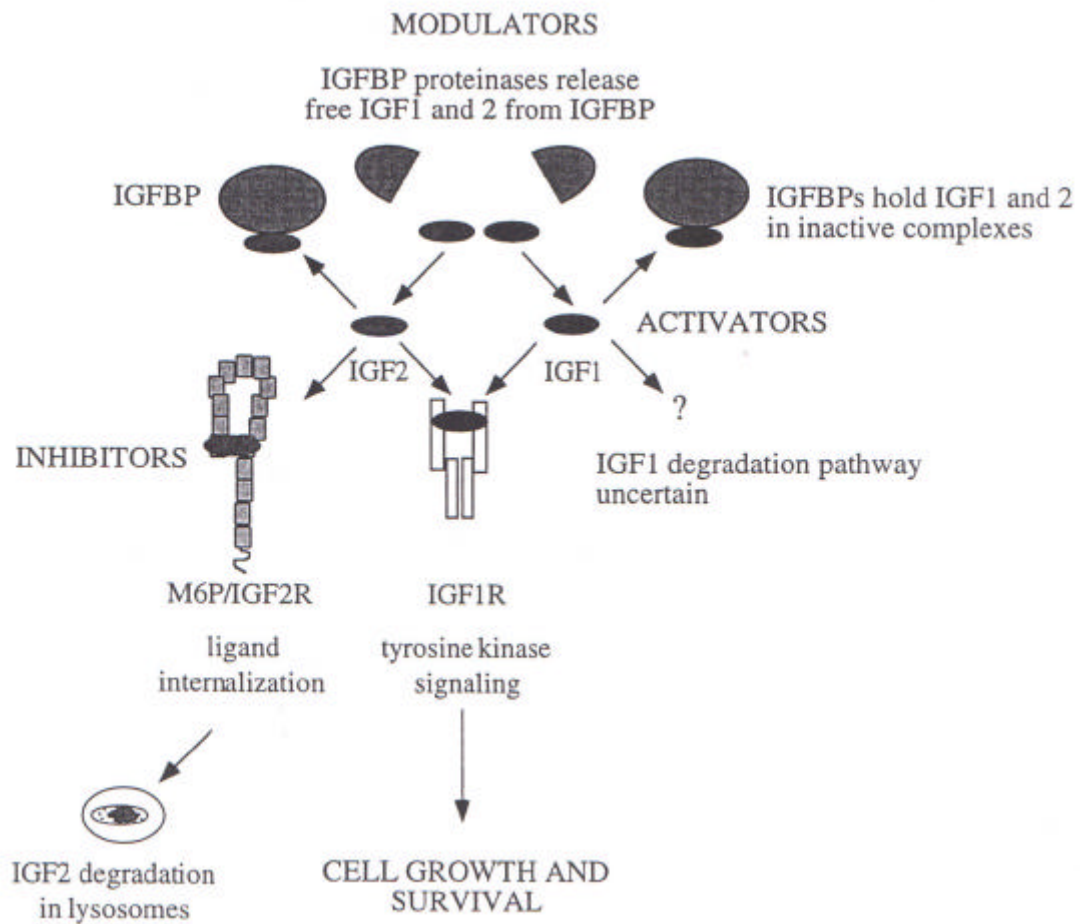
75-95% des zirkulierenden IGF-1 liegen als ein tertiärer Komplex von 150 kDa [Oh (1998)] mit dem IGFBP-3 und der acid-labile subunit (ALS) vor [van Doorn (2001)]. Durch diese Bindung hat das IGF-1 eine Halbwertszeit von 12-16 Stunden. Da es als Komplex die Gefäßmembran nicht durchdringen kann, wird seine Wirkung verhindert. Das IGFBP-3 erfüllt somit die Funktion eines zirkulierenden IGF-Speichers.

Etwa 20 % sind an einen kleineren Komplex von 40-50 kDa gebunden, der die Gefäßmembran durchdringen kann und eine Halbwertszeit von etwa 30 Minuten hat [Zapf (1997)].

Damit IGF-1 die Gefäßmembran passieren und an seinen Rezeptor binden kann, muss der tertiäre Komplex von Proteasen gespalten werden [Oh (1998)]. Diese Proteolyse ist in katabolen Situationen wie bei einer malignen Tumorerkrankung, aber auch bei Schwangerschaft und Stoffwechselkrankheiten wie beispielsweise dem insulinpflichtigen Diabetes mellitus, erhöht [van Doorn (2001)].

Zur Veranschaulichung des Regulationssystem soll folgende Abbildung dienen.

Abb. 2: Die Abbildung zeigt das komplexe Regulationssystem, an dessen Ende die Aktivierung der IGF-1-Rezeptoren steht [Ellis (1998)].



1.11.1.3 Bedeutung für die Tumorentstehung

Dem IGF-1 wird als Mitogen bei der Entstehung von Brustkrebs und anderen malignen Tumoren eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Durch experimentelle Studien konnte gezeigt werden, dass sich die Proliferation von Brustkrebszelllinien durch IGF-1 stimulieren lässt [Jones (1995)] und durch eine Blockade der Rezeptoren durch Antikörper inhibiert wird [Rohlik (1987)]. Immunozytochemische Untersuchungen zeigen, dass die Lokalisation der IGF-1-Rezeptoren im schnell proliferierenden Bereich des Tumors zu finden ist [Pollak (1989)].

Der starke Einfluss des IGF-1 auf das Tumorwachstum konnte durch *in vivo* Studien bestätigt werden. Bei Mäusen, die ein IGF-1-Defizit aufweisen oder die mit IGF-1-Rezeptor-Antikörpern behandelt wurden [Arteaga (1989)], ist die Entstehung von Tumoren gebremst.

Inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Konzentration an Bindungsproteinen und der Entstehung eines Tumors besteht, ist noch nicht vollständig geklärt. Angenommen wurde bisher, dass eine Erhöhung der Bindungsproteine die Wirkung des IGF-1 erniedrigt. Es zeigte sich, dass die IGF-1-Wirkung *in vitro* reduziert ist, wenn IGFBP-3 in hoher Konzentration vorliegt, da die Affinität des IGF-1 zu dem Bindungsprotein höher ist als zu seinem Rezeptor [Martin (1995) in Oh (1998)]. Im Tiermodell fand sich allerdings auch eine inhibierende Wirkung des IGFBP-3 [Pratt und Pollak (1994)].

Neben der Beeinflussung des IGF-1-Spiegels hat IGFBP-3 zusätzlich eine IGF-unabhängige Wirkung, welche die Apoptoserate erhöht. Diese Wirkung wird an spezifischen Proteinen der Zelloberfläche von Brustkrebszellen vermittelt [Oh (1998)].

1.11.1.4 Beeinflussung durch Antiöstrogene

Die Ausschüttung von IGF-1 aus den Leberzellen wird von der Höhe des Östrogenspiegels beeinflusst, da Östrogen die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse fördert und somit indirekt für einen Anstieg des IGF-1 verantwortlich ist [Pollak (1992)]. Übermittelt wird dieser Prozess über spezifische Östrogenrezeptoren in der Hypophyse [McEwen (1979)]. Bei östrogen-rezeptor-positiven Brustkrebszellen führt zusätzlich die Stimulation der Rezeptoren an der Tumorzelle zu einer Ausschüttung von IGF-1, welches dann eine autokrine und parakrine Wirkung auf die umliegenden Zellen zeigt [Bruns (1994)].

Wird durch das Antiöstrogen Tamoxifen die GH-Ausschüttung in den Hypophysenzellen unterdrückt, kommt es zu einem Abfall des IGF-1-Spiegels [Malaab (1992)]. Zusätzlich kommt es durch die Hemmung der Phosphorylierung zu einer direkten Beeinflussung der IGF-1-Rezeptoren durch Tamoxifen [Guvakova (1997)]. Auch wird eine Abnahme der Rezeptorzahl beschrieben [Huynh (1996) in Pollak (1998)].

Da sich in östrogenabhängigen Brustkrebszelllinien mehr IGF-1-Rezeptoren als in den hormonunabhängigen Zellen finden lassen [Pekonen (1988), Peyrat (1992)], wird angenommen, dass hormonabhängige Tumoren stärker durch eine Antiöstrogen-therapie beeinflusst werden können.

Auch das IGFBP-3, das Bindungsprotein mit der höchsten Konzentration im Brustkrebsgewebe [Yu (1998)], zeigt eine Beeinflussbarkeit durch Antiöstrogene. Die Produktion des Bindungsprotein wird gesteigert [Pratt (1993)]. Gegensätzlich zum IGF-1 findet sich in östrogenabhängigen Tumorzellen eine niedrigere Konzentration des Bindungsproteins als in östrogenunabhängigen Zellen [Dubois (1995)].

1.12 Zielsetzung dieser Studie

Es leitet sich ab, dass die Messung der Wachstumsfaktoren VEGF, IGF-1 und des Bindungsproteins IGFBP-3 im Serum eine zusätzliche Möglichkeit zur Früherkennung eines beginnenden malignen Prozesses sein könnte, wenn bereits geringe Veränderungen sensitiv erfassbar wären.

Diese Arbeit untersucht, ob die Beobachtung der Serumwerte von Risikopatientinnen in der Klinik geeignet ist, um Aussagen über ein individuell erhöhtes Risiko innerhalb eines erhöhten Gruppenrisikos zu machen. Außerdem wird die intraindividuelle Konstanz der Werte über einen längeren Zeitraum untersucht, um die Verwendbarkeit der Faktoren als diagnostischen und prognostischen Parameter zu prüfen.

2 Material und Methodik

2.1 Patientinnen

Für die vorliegende Arbeit wurden 106 Frauen untersucht, die als Gemeinsamkeit ein erhöhtes Risiko gegenüber der Normalbevölkerung aufweisen, im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs zu erkranken.

Sie wurden in der Zeit vom Januar 1999 bis Mai 2001 in der Risikosprechstunde der Frauenklinik Charité, Humboldt-Universität, Campus Mitte, behandelt bzw. beraten.

Da es sich um eine sehr heterogene Gruppe handelt, wurde die folgende Einteilung in Haupt- und Subgruppen vorgenommen:

Hauptgruppen:

1. Gesunde Frauen, die aufgrund einer positiven Familienanamnese mit einer oder mehreren an Brustkrebs erkrankten Verwandten die Sprechstunde „Familiärer Brustkrebs“ aufsuchten
2. Patientinnen, die aufgrund einer Präkanzerose (DCIS, CLIS, ADH) behandelt wurden
3. als Kontrollgruppe wurden Patientinnen mit behandeltem Mammakarzinom gewählt

Subgruppen innerhalb der Gruppe der gesunden Frauen:

- 1.1 Nach Menopausenstatus: prämenopausal/ postmenopausal
- 1.2 Risikoberechnung nach Gail, dabei wurde ein Risiko von unter 15% als low risk und ein Risiko von über 15% als high risk bezeichnet

Subgruppen innerhalb der Patientinnen mit Präkanzerose:

- 2.1 Nach Menopausenstatus: prämenopausal/ postmenopausal
- 2.2 Zusätzliche familiäre Belastung
- 2.3 Behandlung mit dem Antiöstrogen Toremifen (Fareston®) im Rahmen der Mammakarzinom-Präventionsstudie

Verlaufskontrollen:

Für die Untersuchung der intraindividuellen Streubreite wurden bei 34 Frauen Verlaufskontrollen durchgeführt.

Der Abstand der Blutentnahmen war dabei nicht streng vorgegeben, sondern richtete sich nach den Kontrolluntersuchungen entsprechend der Wiedervorstellungen in der Risikosprechstunde der Frauenklinik und lag im Mittel bei 8 Monaten (Streubreite 1-25 Monate).

Tab. 1: Verlaufskontrollen

Anzahl der erhobenen Werte	Anzahl der Frauen
2	20
3	9
4	4
5	1

BRCA 1/2-Mutation:

Da nur bei zwei Patientinnen die Diagnose einer BRCA 1-Mutation vorlag, wurde dieses Merkmal nicht gesondert betrachtet, die erhobenen Werte aber mit in die Auswertung einbezogen.

2.1.1 Anamnestische Daten

Folgende anamnestische Daten wurden durch Befragung der Patientinnen und aus den Krankenunterlagen aufgenommen:

Tab. 2: Gesamtgruppe n=106; Median (Streubreite)

Alter	47 (22-67)
Größe (cm)	167 (153-179)
Gewicht (kg)	64 (47-100)
Menarchealter	13 (11-17)
Alter bei 1.Geburt	24 (15-35)
Anzahl der Verwandten 1.Grades mit Mammakarzinom	1 (0-3)
Anzahl der Verwandten 2.Grades mit Mammakarzinom	0 (0-5)
Anzahl der Biopsien	0 (0-3)

Tab. 3: Gesunde Frauen mit familiärer Belastung; Median (Streubreite)

	Gesamt n=65	Prämenopausal n=39	Postmenopausal n=26	low risk n=14	high risk n=46
Alter	45 (23-67)	38 (23-56)	56 (34-67)	56,5 (32-67)	44,5 (25-67)
Größe (cm)	167 (153-178)	168 (155-178)	167 (153-175)	167 (155-175)	167,5 (153-178)
Gewicht (kg)	64 (47-100)	60 (47-100)	66,5 (50-85)	66,5 (51-78)	62 (47-100)
Menarchealter	13 (11-16)	12 (11-16)	13 (11-15)	13 (12-15)	12 (11-15)
Alter bei 1.Geburt	23 (15-37)	24 (15-37)	22,5 (19-32)	23 (15-37)	24 (18-28)
Anzahl der Verwandten 1.Grades mit Mammakarzinom	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-1)	1 (1-3)
Anzahl der Verwandten 2.Grades mit Mammakarzinom	1 (0-5)	1 (0-5)	0 (0-2)	1 (0-3)	0 (0-5)
Anzahl der Biopsien	0 (0-3)	0 (0-2)	1 (0-3)	0 (0-1)	0 (0-3)

Tab. 4: Patientinnen mit Präkanzerose; Median (Streubreite)

	Gesamt n=30	Prä- menopausal n=13	Post- menopausal n=17	Mit familiärer Belastung n=10	Ohne familiäre Belastung n=20	Toremifen (Fareston®) n=18	Kontrolle n=12
Alter	54 (22-63)	44 (22-54)	59 (50-63)	59,5 (39-63)	51 (22-63)	54 (40-63)	55 (22-61)
Größe (cm)	163,5 (153-179)	167 (155-179)	163 (153-175)	166,5 (162-170)	163 (153-179)	163,5 (155-179)	165 (153-178)
Gewicht (kg)	63 (47-100)	63 (50-86)	63 (47-100)	61 (47-69)	66,5 (51-100)	63 (55-97)	63 (47-100)
Menarchealter	13 (11-17)	13 (11-15)	14 (11-17)	14 (11-17)	13 (11-16)	13,5 (11-16)	13 (11-17)
Alter bei 1.Geburt	24 (18-35)	28 (21-35)	22,5 (18-30)	23 (21-35)	24 (18-31)	24 (18-35)	25 (21-31)
Anzahl der Verwandten 1.Grades mit Mammakarzinom	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0	0	0 (0-1)
Anzahl der Verwandten 2.Grades mit Mammakarzinom	0 (0-4)	0 (0-2)	0 (0-4)	1 (0-4)	0	0 (0-2)	0 (0-4)
Anzahl der Biopsien	1 (0-2)	1 (0-2)	1 (0-2)	0,5 (0-2)	1 (1-2)	1 (0-2)	1 (0-2)

Tab. 5: Patientinnen mit Mammakarzinom n=11; Median (Streubreite)

Alter	56 (33-67)
Größe (cm)	167 (157-179)
Gewicht (kg)	68 (52-80)
Menarchealter	13 (11-16)
Alter bei 1.Geburt	25 (20-34)
Anzahl der Verwandten 1.Grades mit Mammakarzinom	1 (0-2)
Anzahl der Verwandten 2.Grades mit Mammakarzinom	0 (0-3)
Anzahl der Biopsien	1 (0-1)

2.1.2 Risikoberechnung

Für jede Frau wurde das individuelle Risiko für die Erkrankung an Brustkrebs nach den anamnestischen Daten berechnet.

Dazu wurden die Risikomodelle nach Gail und Chang-Claude verwendet. Die Abschätzung nach Chang-Claude erfolgte mit Hilfe der Tabellen des Deutschen Krebsforschungszentrums, die Berechnung nach Gail wurde mit dem *Gail Model Risk Assessment Tool*, Cardinal Health Systems Inc., November 1998 durchgeführt.

2.1.3 Toremifeneinnahme

Die Patientinnen aus der Gruppe der Frauen mit Präkanzerose, die im Rahmen der Mammakarzinompräventionsstudie mit Antiöstrogenen behandelt wurden, erhielten 60 mg Toremifen (Fareston®) pro Tag.

2.2 Methodik

Für die quantitative Bestimmung der Wachstumsfaktoren IGF-1, VEGF und das Bindungsprotein IGFBP-3 wurde Serum gewonnen und ein Sandwich-ELISA verwendet.

Gebilligt wurde die Nutzung der Blutproben für Forschungszwecke von der Ethikkommission der Charité.

Die Messung wurde im endokrinologischen Labor der Frauenklinik Charité, Campus Mitte durchgeführt.

2.2.1 Gewinnung der Proben

Den Probandinnen wurde mittels einer 10 ml Serummonovette Blut abgenommen und zentrifugiert. Zur Vermeidung wiederholten Auftauens wurden die Serumproben portionsweise in Kryoröhrchen überführt und bei -18°C gelagert.

2.2.2 Theoretisches Prinzip des Sandwich-ELISA (Enzymimmunoassay)

Abb. 3: Die Mikrotiterplatten sind mit einem mono- bzw. polyklonalen Antikörper gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet.

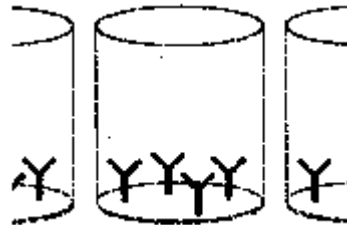


Abb. 4: Die Platten werden mit den Proben beschichtet. Die zu bestimmende Substanz bindet an die Antikörper.

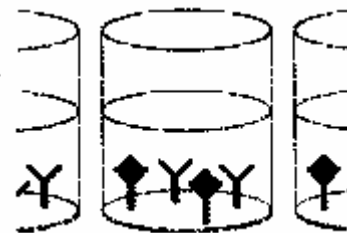


Abb. 5: Nach Inkubation und Waschen wird ein zweiter polyklonaler Antikörper zugegeben. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt.

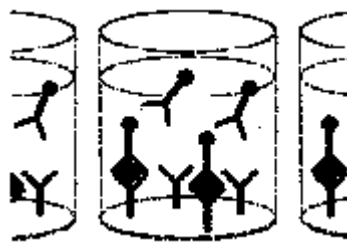


Abb. 6: Nach einer zweiten Inkubation und weiterem Waschen werden die Mikrotiterplatten mit einer Chromogenlösung beschichtet, die mit dem Enzym reagiert.

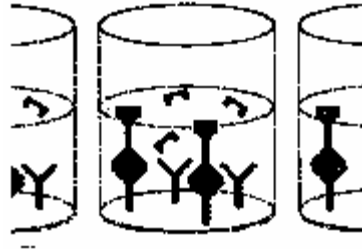
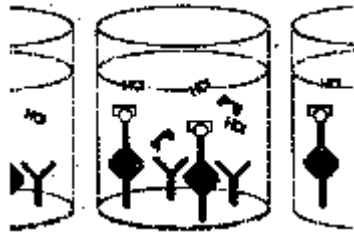


Abb. 7: Durch Zugabe einer Säurelösung wird die Farbreaktion gestoppt und die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen. Die Absorption ist der Konzentration der zu bestimmenden Substanz direkt proportional.



2.2.3 Quantitative Bestimmung von VEGF im Serum

Verwendet wurde der Quantikine® Human VEGF Immunoassay der Firma R&D Systems, Minneapolis, USA.

Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem monoklonalen VEGF-Antikörper beschichtet.

Durchführungsvorschrift:

1. Herstellen einer Standardreihe: Pipettieren von 500 µl Standard (2000 pg/ml VEGF in Proteinpuffer) in 500 µl Diluent (tierisches Serum) zum Verdünnen auf 1000 pg/ml, weiteres Verdünnen auf 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,2 pg/ml.
2. 100 µl Assaypuffer (Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben.
3. Pipettieren der VEGF-Standards 1-8, der Kontrolle aus Poolserum, sowie des Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 100 µl des Materials in zwei Vertiefungen einbringen, um Doppelbestimmungen zu erhalten. Für 2h bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler (500-600 rpm) inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 3× mit 400 µl Waschlösung (gepufferte Surfactantlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 200 µl Antikörper-Enzym-Konjugat (an Meerrettichperoxidase [HRP] gekoppelte polyklonale VEGF-Antikörper) in jede Vertiefung geben, 2h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubieren.
6. 3× mit 400 µl Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 200 µl Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] mit Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung geben, auf dem Horizontalschüttler für 25 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 50 µl Stopplösung (2 N Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
9. Absorption der Lösung nach 25 min. bei 450 nm messen.

Standards: Recombinantes humanes VEGF₁₆₅

Normalwerte des Herstellers: n= 37 (keine Angaben zu Geschlecht und Alter)

Mittelwert (pg/ml)	Streubreite (pg/ml)
220	62-707

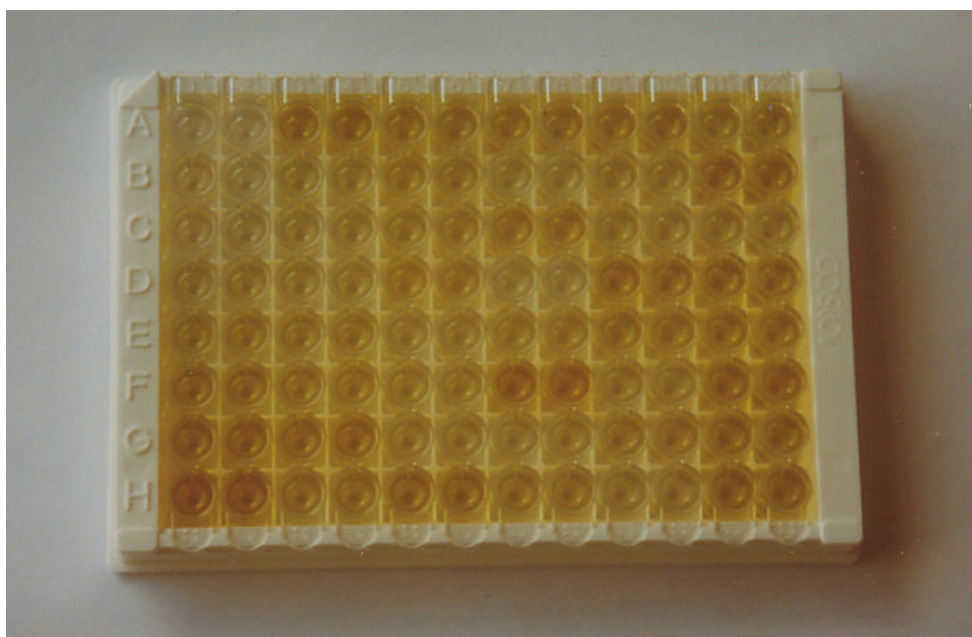
Sensitivität: 9 pg/ml

Präzision:

	Mittelwert (pg/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
Intra-Assay	235	< 5
Inter-Assay	388	7

Quelle: R&D Systems Durchführungsvorschrift

Abb. 8: Mikrotiterplatte (Foto) und Bearbeitungsschema (Kontrollen [KO], Standard [ST], Patientenmaterial [Pat])



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KO 1	KO 1	ST 8	ST 8	Pat 8	Pat 8	Pat 16	Pat 16	Pat 24	Pat 24	Pat 32	Pat 32
B	ST 1	ST 1	Pat 1	Pat 1	Pat 9	Pat 9	Pat 17	Pat 17	Pat 25	Pat 25	Pat 33	Pat 33
C	ST 2	ST 2	Pat 2	Pat 2	Pat 10	Pat 10	Pat 18	Pat 18	Pat 26	Pat 26	Pat 34	Pat 34
D	ST 3	ST 3	Pat 3	Pat 3	Pat 11	Pat 11	Pat 19	Pat 19	Pat 27	Pat 27	Pat 35	Pat 35
E	ST 4	ST 4	Pat 4	Pat 4	Pat 12	Pat 12	Pat 20	Pat 20	Pat 28	Pat 28	Pat 36	Pat 36
F	ST 5	ST 5	Pat 5	Pat 5	Pat 13	Pat 13	Pat 21	Pat 21	Pat 29	Pat 29	Pat 37	Pat 37
G	ST 6	ST 6	Pat 6	Pat 6	Pat 14	Pat 14	Pat 22	Pat 22	Pat 30	Pat 30	Pat 38	Pat 38
H	ST 7	ST 7	Pat 7	Pat 7	Pat 15	Pat 15	Pat 23	Pat 23	Pat 31	Pat 31	KO 2	KO 2

2.2.4 Quantitative Bestimmung von IGF-1 im Serum

Verwendet wurde der ACTIVE™ Non-Extraction IGF-1 ELISA der Firma DSL Deutschland, Sinsheim.

Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem IGF-1-Antikörper beschichtet.

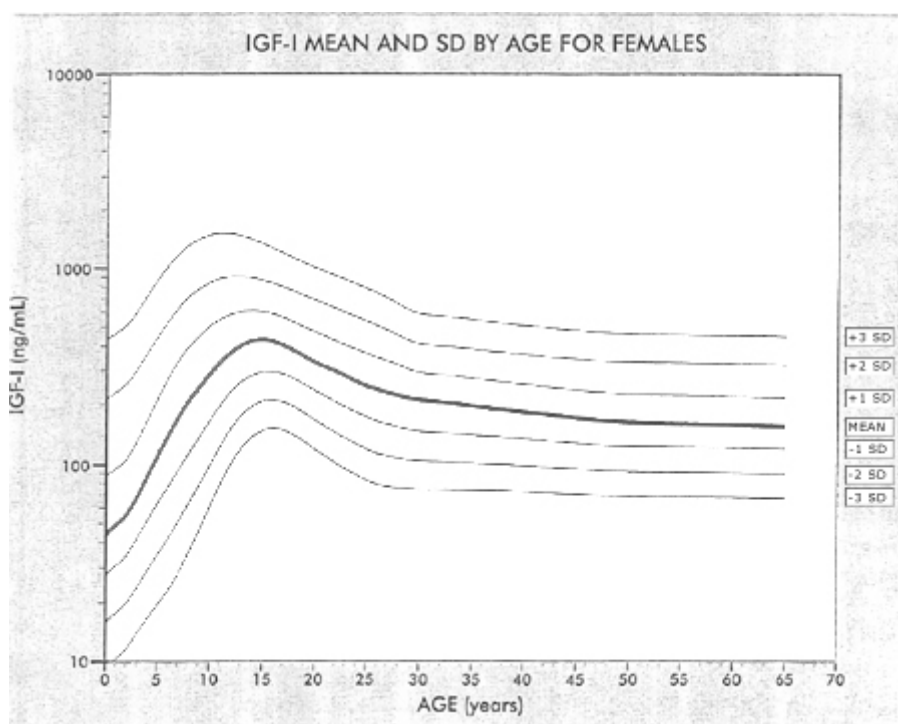
Durchführungsvorschrift:

1. Verdünnung der Proben: 20 µl Serum in ein Polypropylenröhrchen pipettieren und mit 990 µl Probenpuffer 1 mischen, 30 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
990 µl Probenpuffer 2 hinzugeben, mischen.
2. Pipettieren der IGF-1-Standards A-E (IGF-1 in Proteinpuffer [BSA]) in den Konzentrationen von 0 ;7 ng/ml; 8 ng/ml; 60 ng/ml; 167 ng/ml; 580 ng/ml), der Kontrolle 1 (niedrige IGF-1-Konzentration) und Kontrolle 2 (hohe IGF-1-Konzentration), sowie des vorbehandelten Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 20 µl des Materials in zwei Vertiefungen einbringen, um Doppelbestimmungen zu erhalten.
3. 100 µl Assaypuffer (Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben, auf einem Horizontalschüttler (500-600rpm) für 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 5× mit 350 µl Waschlösung (gepufferte Salzlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 100 µl Antikörper-Enzym-Konjugat (an Meerrettichperoxidase [HRP] gekoppelte IGF-1-Antikörper) in jede Vertiefung geben, 30 min. bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubieren.
6. 5× mit 350 µl Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 100 µl Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung geben, auf dem Horizontalschüttler für 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 100 µl Stopplösung (0,2 M Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
9. Absorption der Lösung nach 30 min. bei 450 nm messen.

Standards: Die Standards wurden gegen die WHO-Referenzpräparation 87/518 kalibriert.

Normalwerte des Herstellers:

Abb. 9: IGF-1-Werte von Frauen in Abhängigkeit des Alters



Sensitivität : 0,01 ng/ml

Präzision:

	Mittelwert (ng/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
Intra-Assay	250	< 5
Inter-Assay	250	6

Quelle: DSL Durchführungsvorschrift

Es wurde zusätzlich ein laborinterner Intra-Assay durchgeführt:

N= 25	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
	176,9	14,91	8,4

2.2.5 Quantitative Bestimmung von IGFBP-3 im Serum

Verwendet wurde der ACTIVE™ IGFBP-3 ELISA der Firma DSL Deutschland, Sinsheim.

Die 96 Vertiefungen der Mikrotiterplatte sind mit einem polyklonalen IGFBP-3-Antikörper beschichtet.

Durchführungsvorschrift:

1. Verdünnung der Proben: 20 µl Serum werden 1:100 mit Nullstandard (Proteinpuffer [BSA]) verdünnt.
2. Pipettieren der IGFBP-3-Standards A-F (IGFBP-3 in Proteinpuffer [BSA] in den Konzentrationen von 0; 2 ng/ml; 5 ng/ml; 20 ng/ml; 50 ng/ml; 100 ng/ml), der Kontrolle 1 (niedrige IGFBP-3-Konzentration) und Kontrolle 2 (hohe IGFBP-3-Konzentration), sowie des vorbehandelten Probenmaterials in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Dabei je 25 µl des Materials in zwei Vertiefungen einbringen, um Doppelbestimmungen zu erhalten.
3. 50 µl Assaypuffer (Proteinpuffer [BSA]) in jede Vertiefung geben, auf einem Horizontalschüttler (500-600 rpm) für 2h bei Raumtemperatur inkubieren.
4. Die Vertiefungen absaugen und 5× mit 350 µl Waschlösung (gepufferte Salzlösung) waschen, auf Fließpapier trocken klopfen.
5. 100 µl Antikörper-Enzym-Konjugat (an Meerrettichperoxidase [HRP] gekoppelte IGFBP-3-Antikörper [Ziege, polyklonal]) in jede Vertiefung geben, 1h bei Raumtemperatur auf dem Horizontalschüttler inkubieren.
6. 5× mit 350 µl Waschlösung waschen und auf Fließpapier trocken klopfen.
7. 100 µl Chromogenlösung (Tetramethylbenzidin [TMB] in Zitratpuffer mit Wasserstoffperoxid) in jede Vertiefung geben, auf dem Horizontalschüttler für 10 min. bei Raumtemperatur inkubieren.
8. 100 µl Stopplösung (0,2 M Schwefelsäure) in jede Vertiefung geben.
9. Absorption der Lösung nach 30 min. bei 450 nm messen.

Standards: Die Standards wurden gegen den recombinant DNA-derived non-glycosylated human IGFBP-3-Standard der Firma Celtrix Pharmaceutical Inc. kalibriert.

Normalwerte des Herstellers: Frauen n=33

Mittelwert (ng/ml)	Median (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Streubreite (ng/ml)
3820	3800	690	2670-5580

Sensitivität: 0,04 ng/ml

Präzision:

	Mittelwert (ng/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
Intra-Assay	2743	9,5
Inter-Assay	2513	10,4

Quelle: DSL Durchführungsvorschrift

Es wurde zusätzlich ein laborinterner Intra-Assay durchgeführt:

N= 24	Mittelwert (ng/ml)	Standardabweichung (ng/ml)	Variationskoeffizient V.K. (%)
	3433	112,8	3,29

2.2.6 Auswertung

Die Messung der Absorption erfolgte an dem Mikrotiterplattenmeßgerät 400 SF der Firma SLT.

Für die Umrechnung der optischen Dichten in Konzentrationen wurde das PC-Programm Synelisa 3.0 der Firma Elias Medizintechnik, Freiburg, Deutschland verwendet.

Es wurde damit eine Spline-Approximation OD/OD max.% durchgeführt und so eine Eichkurve erstellt, mit Hilfe derer die Patientenwerte berechnet wurden.

Beispiel:

Abb. 10: Eichkurve für VEGF

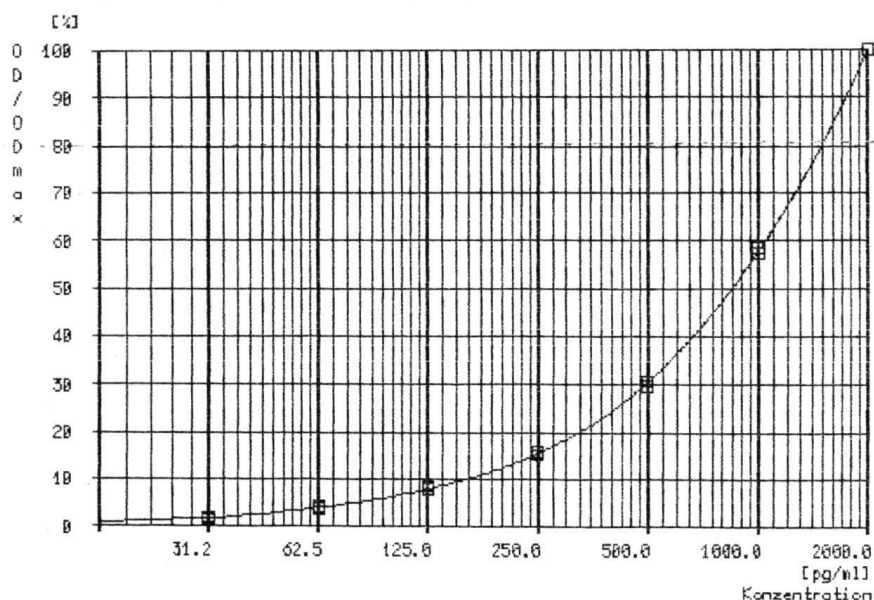
Berechnung der Synelisa - Messwerte
mit Hilfe einer Spline-Approximation

Test : VEGF

Standardkurve :

Alle Konzentrationsangaben in pg/ml

Bezeichnung	Konzentration	Opt.Dichte		Mittelwert OD/ODmax %	
A 1 A 2	S 1	0.0	0.104 0.100	0.102	0.0
B 1 B 2	S 2	31.2	0.150 0.141	0.146	1.8
C 1 C 2	S 3	62.5	0.202 0.194	0.198	4.1
D 1 D 2	S 4	125.0	0.305 0.290	0.298	8.3
E 1 E 2	S 5	250.0	0.478 0.459	0.469	15.5
F 1 F 2	S 6	500.0	0.829 0.808	0.819	30.3
G 1 G 2	S 7	1000.0	1.482 1.456	1.469	57.8
H 1 H 2	S 8	2000.0	2.468 2.468	2.468	100.0



2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows.

Für jede Haupt- und Subgruppe wurden Median und Mittelwert berechnet und graphisch aufgetragen.

Da die Gruppen nicht normalverteilt sind, erfolgte für den Vergleich der Gruppen die Durchführung des nichtmetrischen Mann-Whitney-Tests für unabhängige Stichproben. Für den Vergleich mit Tumorpatientinnen einer früheren Studie erfolgte die Durchführung des T-Test für unabhängige Stichproben.

Die Ergebnisse wurden auf Signifikanzen geprüft. Dabei wurden p-Werte unter 0,05 als signifikant betrachtet.

2.4 Erstellung der Diagramme

Für die Erstellung der Diagramme wurde das PC-Programm Microsoft Excel verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Serumkonzentrationen von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3

3.1.1 Vergleich der Haupt- und Subgruppen

Um mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar zu machen, wurden die Messergebnisse als Punktemengen aufgetragen und sowohl Mittel- als auch Medianwerte der Haupt- und Subgruppen eingetragen.

3.1.2 Intraindividuelle Verläufe

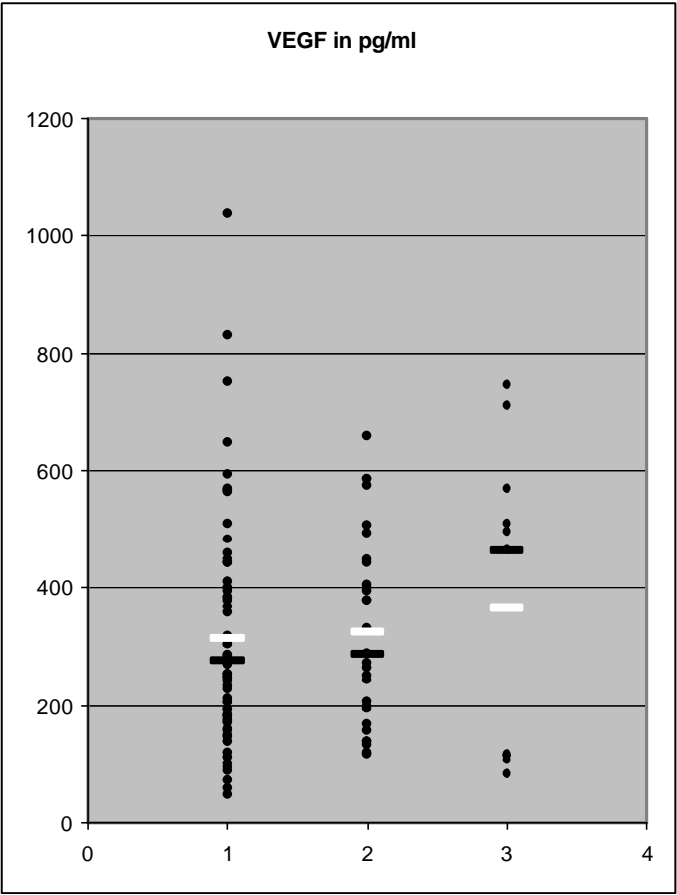
Es wurden Diagramme von den intraindividuellen Verläufen als Gesamtgruppe und in einzelnen Subgruppen erstellt.

Eine Übersicht der erhobenen Daten, sowie die Ergebnisse der Gruppenvergleiche (p-Werte) finden sich im Anhang, zunächst sollen an dieser Stelle wesentliche Ergebnisse beschrieben werden.

3.1.2.1 VEGF

Insbesondere beim VEGF zeigt sich durch die Auftragung der Werte als Punktemenge eine ausgeprägte interindividuelle Streubreite (43,6 bis 1038 pg/ml) (s. Abb.11). Zwischen den Hauptgruppen *Familiäre Belastung* und *nachgewiesene Präkanzerose* und der Vergleichsgruppe *Mammakarzinom* lassen sich keine signifikanten Unterschiede der Verteilung feststellen ($p>0,05$).

Abb. 11: VEGF, Vergleich der Hauptgruppen



	Gruppe	Mittelwert (pg/ml) [weiss]	Median (pg/ml) [schwarz]
1	Familiäre Belastung	314	277
2	Präkanzerose	325	288
3	Mammakarzinom	367	465

Intraindividuelle Verlaufsbeobachtung:

Vergleicht man die Einzelwerte im Verlauf miteinander, zeigen sich intraindividuelle Streubreiten im Mittel von 115 pg/ml (Median 118,5, Range 2-310) (s. Abb.12). Bei 29,4% der Verläufe (10 Patientinnen) finden sich Differenzen von über 150 pg/ml, bei 8,8% (3 Patientinnen) über 250 pg/ml.

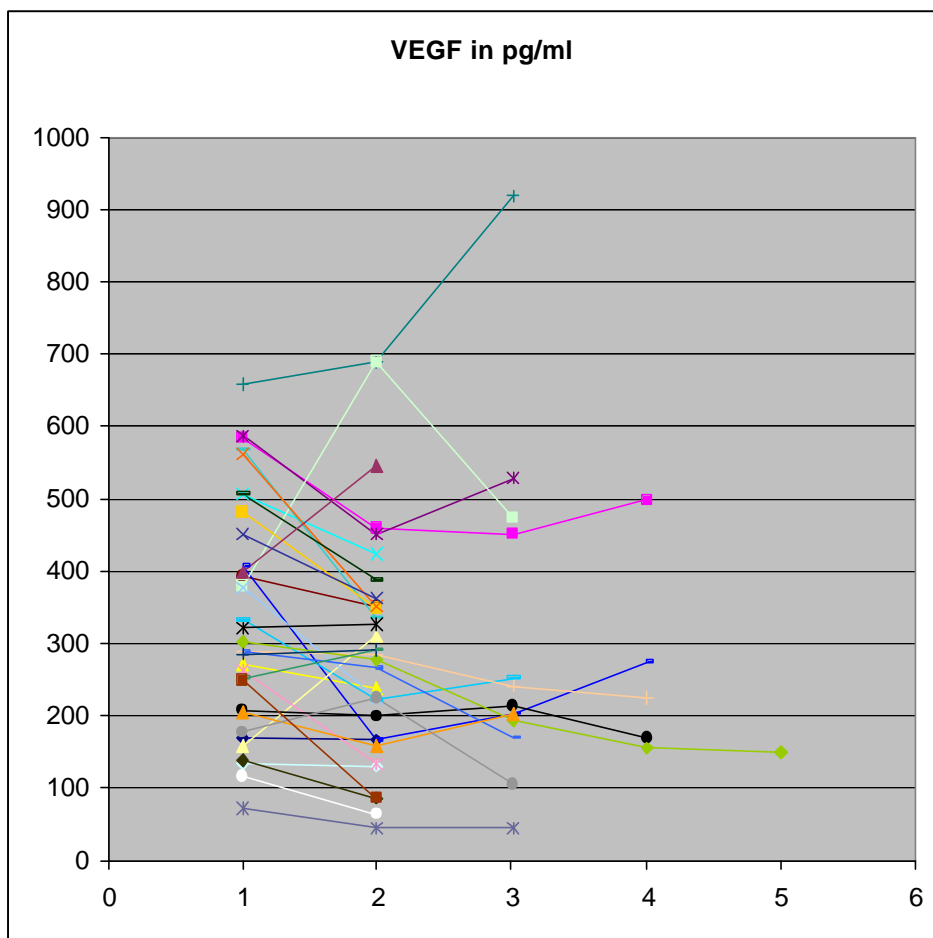


Abb. 12: Intraindividuelle Streubreite der VEGF-Serumwerte (n=34)

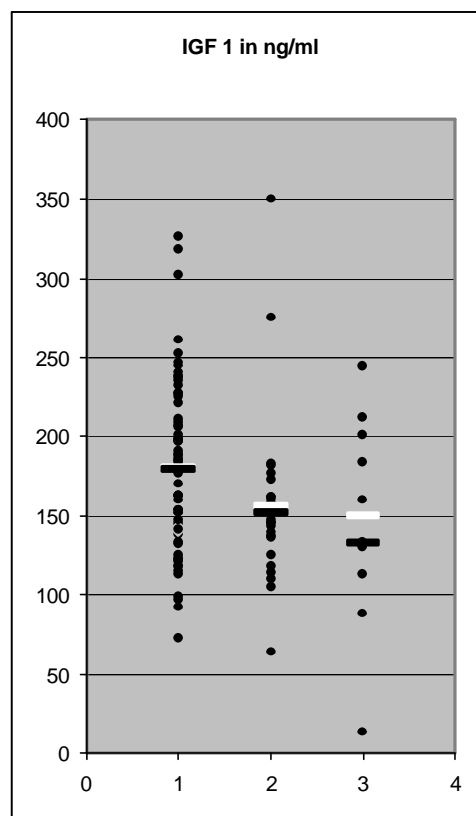
(1-5= Zeitpunkte der Blutabnahmen)

3.1.2.2 IGF-1 und IGFBP-3

IGF-1:

Die interindividuellen IGF-1-Werte schwanken in einem Bereich von 13,4 bis 350 ng/ml (s. Abb. 13). Die Werte in der Gruppe der gesunden Frauen mit familiärer Belastung sind signifikant höher als die Werte in der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose ($p=0,019$), nicht aber als die Werte in der Gruppe der Patientinnen mit Mammakarzinom ($p>0,05$). Zwischen den Gruppen der Patientinnen mit Präkanzerose und den Patientinnen mit Mammakarzinom gibt es keinen signifikanten Unterschied ($p>0,05$).

Abb. 13: IGF-1, Vergleich der Hauptgruppen



	Gruppe	Mittelwert (ng/ml) [weiss]	Median (ng/ml) [schwarz]
1	Familiäre Belastung	180	179
2	Präkanzerose	156	152
3	Mammakarzinom	150	133

Intraindividuelle Verlaufsbeobachtung:

Es zeigen sich intraindividuelle Streubreiten der Werte im Mittel von 36 ng/ml (Median 27,5, Range 0-134) (s. Abb.14). Bei 17,6 % der Verläufe (6 Patientinnen) finden sich Differenzen von über 60 ng/ml, bei 5,9% (2 Patientinnen) über 100 ng/ml.

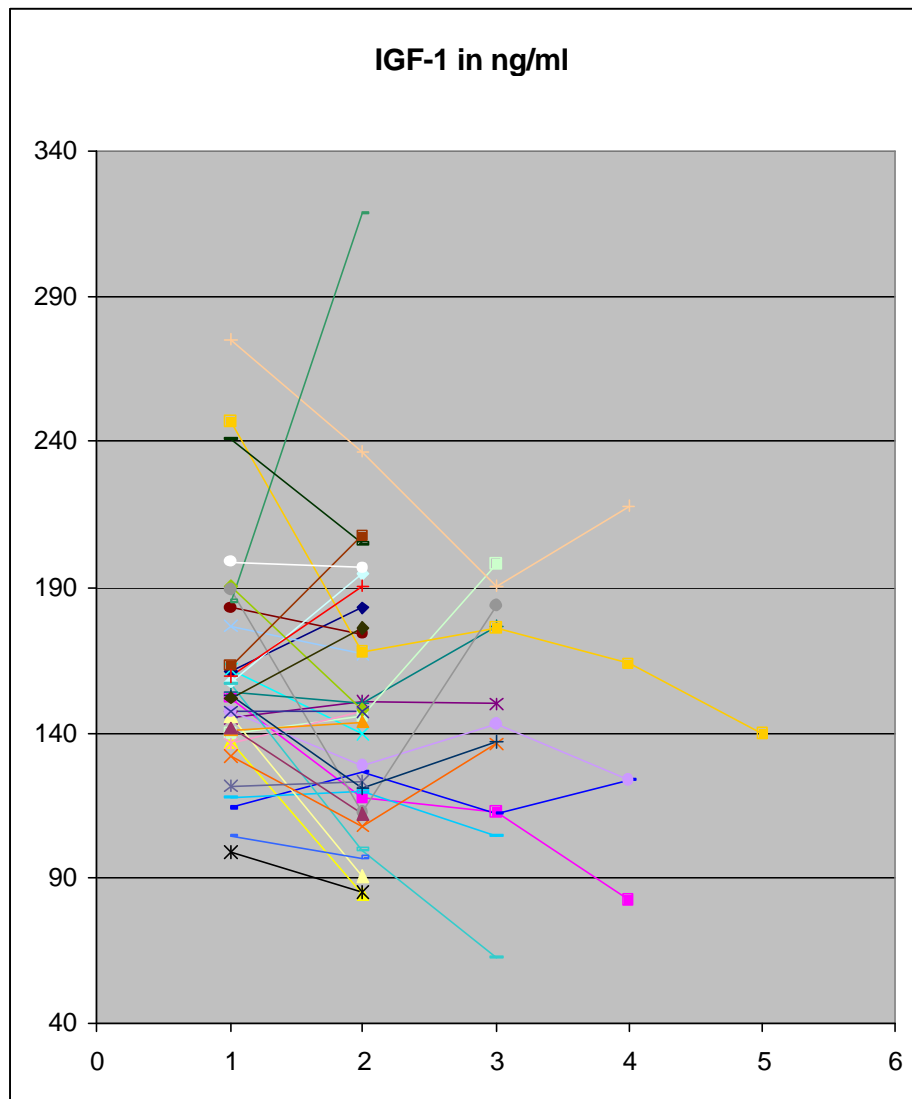


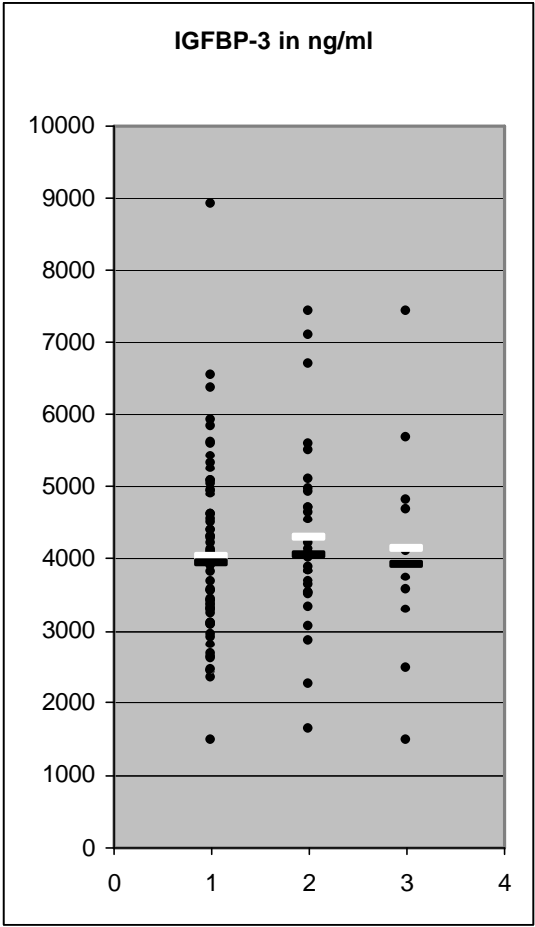
Abb. 14: Intraindividuelle Streubreite der IGF-1-Serumwerte (n=34)

(1-5= Zeitpunkte der Blutabnahmen)

IGFBP-3:

Die interindividuelle Streubreite der Werte des Bindungsproteins IGFBP-3 liegt bei 1493-7434 ng/ml (s. Abb.15). Es lassen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen *Familiäre Belastung*, *Präkanzerose* und *Mammakarzinom* feststellen ($p>0,05$).

Abb. 15: IGFBP-3, Vergleich der Hauptgruppen



	Gruppe	Mittelwert (ng/ml) [weiss]	Median (ng/ml) [schwarz]
1	Familiäre Belastung	4034	3935
2	Präkanzerose	4299	4059
3	Mammakarzinom	4130	3921

Intraindividuelle Verlaufsbeobachtung:

Es zeigen sich intraindividuelle Streubreiten der Werte im Mittel von 1792 ng/ml (Median 1587, Range 1-4074) (s. Abb.16). Bei 14 Verläufen finden sich Differenzen von über 2000 ng/ml.

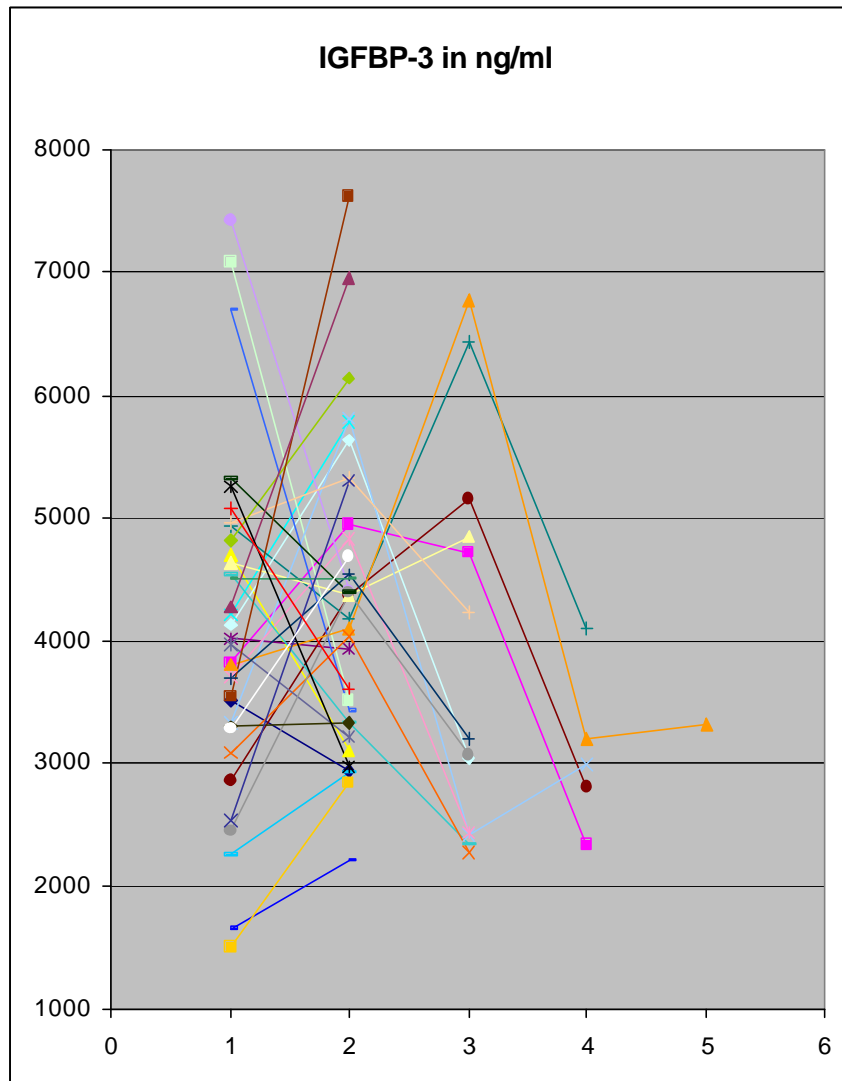


Abb. 16: Intraindividuelle Streubreite der IGFBP-3-Serumwerte (n=34)

(1-5= Zeitpunkte der Blutabnahmen)

3.1.2.3 IGF-1/IGFBP-3-Ratio

Auch durch Bildung der IGF-1/IGFBP 3-Ratio zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hauptgruppen ($p > 0,05$).

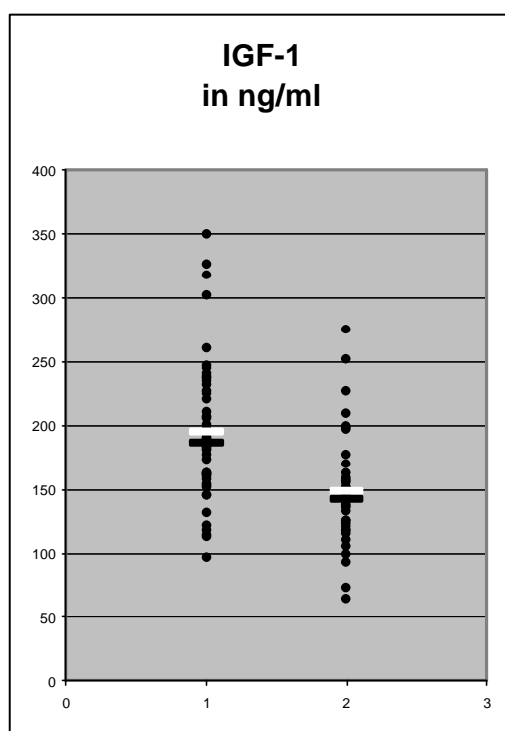
3.1.2.4 Vergleich der Subgruppen

Der Vergleich der Serumkonzentrationen von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3 zwischen den Subgruppen zeigt bei allen der untersuchten Parameter keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Nur bei Vergleich der IGF-1-Werte bezüglich des Menopausenstatus finden sich sowohl in der Gesamtgruppe aller untersuchten Frauen, als auch in der Hauptgruppe der Patientinnen mit Präkanzerose und in der Hauptgruppe der familiär belasteten Frauen signifikante Unterschiede. Es lassen sich in allen Gruppen signifikant höhere Werte der prämenopausalen Frauen feststellen.

(Gesamtgruppe: $p < 0,000$; Präkanzerose: $p = 0,003$; familiäre Belastung: $p = 0,001$)

Abb. 17: Vergleich der IGF-1-Werte der Subgruppen prä-/ postmenopausal



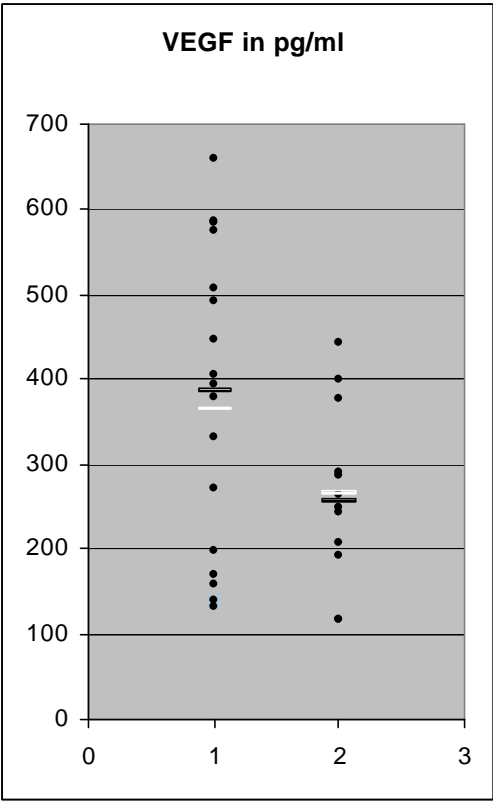
	Gruppe	Mittelwert (ng/ml) [weiss]	Median (ng/ml) [schwarz]
1	prämenopausal	195	186
2	postmenopausal	148	143

3.1.3 Auswirkungen durch Toremifen (Fareston®)

Eine Auswirkung der Antiöstrogenbehandlung auf die Höhe der Serumwerte von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3 lässt sich nicht zeigen, bei keinem der drei Parameter kann ein signifikanter Unterschied zwischen Therapie- und Kontrollgruppe festgestellt werden ($p>0,05$) (s. Abb.18-20)

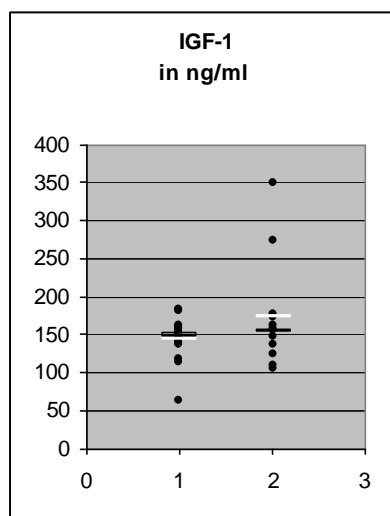
Auch zeigen die individuellen Verläufe bei keinem der untersuchten Faktoren einen Trend zum Abfall oder Anstieg der Werte unter der Therapie (s. Abb.21).

Abb. 18: VEGF, Vergleich der Subgruppen Toremifen/ Kontrolle



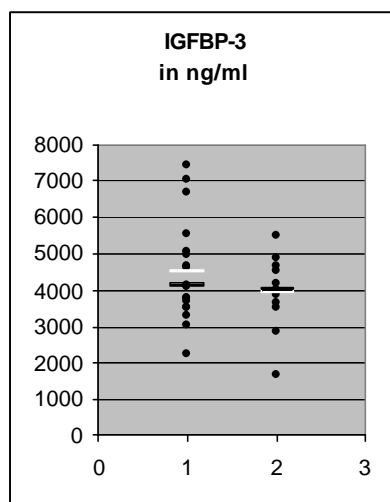
	Gruppe	Mittelwert (pg/ml) [weiss]	Median (pg/ml) [schwarz]
1	Toremifen	365	387
2	Kontrolle	266	258

Abb. 19: IGF-1 Vergleich der Subgruppen Toremifen/ Kontrolle



	Gruppe	Mittelwert (pg/ml) [weiss]	Median (pg/ml) [schwarz]
1	Toremifen	145	149
2	Kontrolle	173	157

Abb. 20: IGFBP-3, Vergleich der Subgruppen Toremifen/ Kontrolle



	Gruppe	Mittelwert (ng/ml) [weiss]	Median (ng/ml) [schwarz]
1	Toremifen	4527	4116
2	Kontrolle	3957	4021

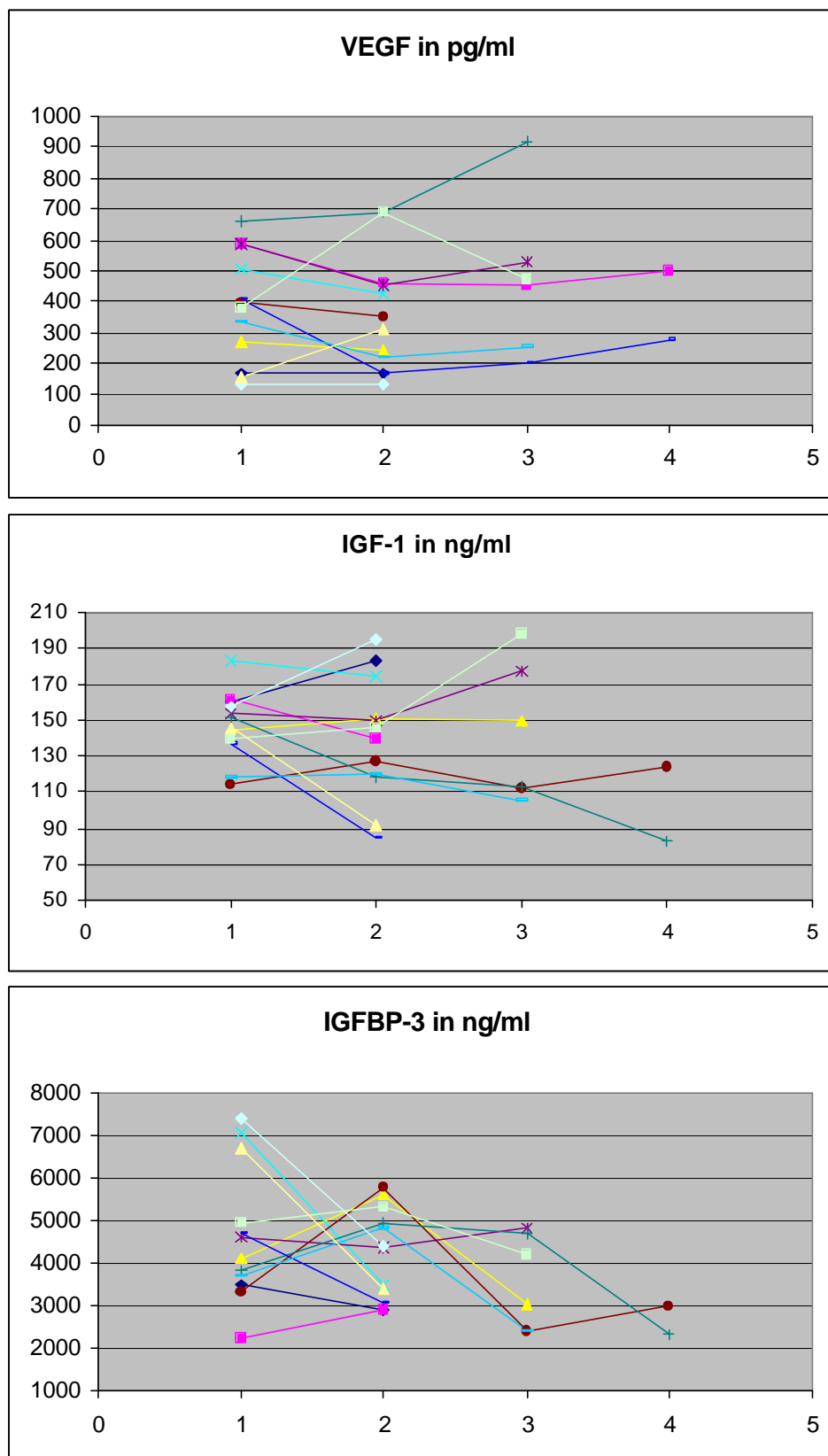


Abb. 21: Veränderung der VEGF-, IGF-1- und IGFBP-3-Konzentration unter Toremifen
(1-4= Zeitpunkte der Blutabnahmen)

3.2 Vergleich der VEGF-Werte mit denen eines Normalkollektives

Sowohl die Gesamtgruppe als auch die Gruppen der familiär belasteten Frauen und die Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose wurden mit VEGF-Werten von 234 gesunden Frauen ohne ersichtliche Risiken verglichen.

Weder der Vergleich mit der Gesamtgruppe der Frauen ohne Risiken, noch mit der Gruppe der prämenopausalen (n=135) oder der Gruppe der postmenopausalen Frauen (n=99) erbrachte signifikante Unterschiede ($p > 0,05$).

3.3 Vergleich der VEGF-Werte mit denen von Tumorpatientinnen

Ein Vergleich mit den im selben Labor erhobenen Daten von Patientinnen mit malignen und benignen Tumoren [Ernhardt (1999)] ergab folgende Ergebnisse. Sowohl die Frauen mit Präkanzerose als auch die familiär belasteten Frauen hatten signifikant niedrigere VEGF-Werte als die Patientinnen mit einem malignen Tumor (Mittelwert=442 pg/ml) ($p < 0,001$) und niedrigere Werte als die Patientinnen mit benignen Tumoren (Mittelwert=348 pg/ml). Diese Differenzen waren jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

3.4 Vergleich der Risikomodelle nach Gail und nach Chang-Claude

Bei den 24 Frauen, deren anamnestische Daten die genaue Risikoberechnung nach beiden Modellen zuließ, fiel eine Diskrepanz zwischen den Ergebnissen auf, so unterscheidet sich das Risiko bei 9 Frauen (37,5 %) um mehr als 10 Prozentpunkte, bei 5 Frauen (20,8 %) um 15 Prozentpunkte.

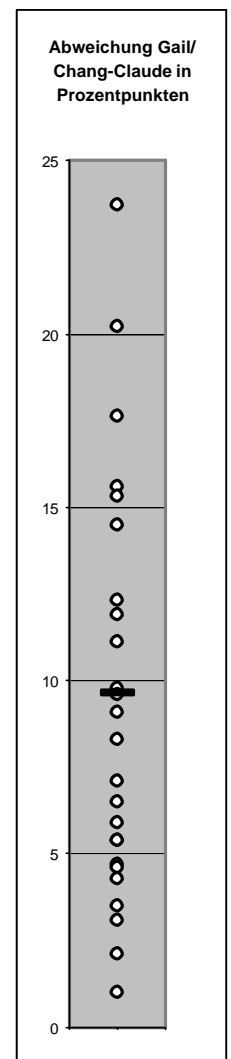
Nach dem Gail-Modell liegen die errechneten Risiken zwischen 6,4 und 40,1 %; nach dem Chang-Claude-Modell zwischen 10,7 % und 43,2 %.

Im Mittel kann eine Abweichung von 9,65 Prozentpunkten festgestellt werden (Range 2,1-23,7) (s. Abb.22).

Dabei errechnen sich nach dem Chang-Claude-Modell in 15 Fällen höhere Risiken, in 9 Fällen nach dem Gail-Modell.

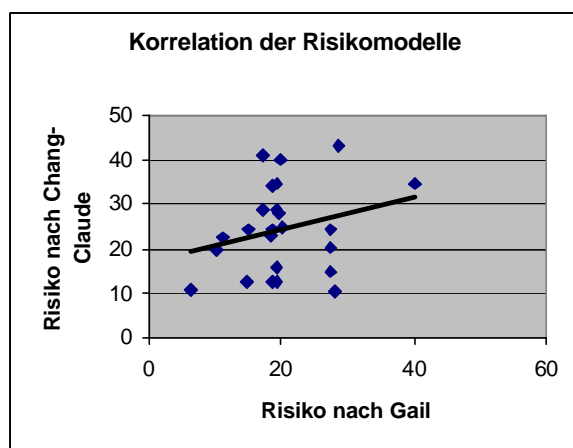
Insbesondere bei den Frauen mit einem nach dem Modell von Chang-Claude errechneten sehr hohen Risiko (> 30) kommt die Berechnung nach Gail zu weit niedrigeren Werten.

Abb. 22: Abweichung der Risikoberechnung nach den Modellen Gail und Chang-Claude, n=24



Durch Auftragung in ein Korrelationsdiagramm lässt sich deutlich die geringe Korrelation der beiden Modelle erkennen.

Abb. 23: Korrelation der Risikomodelle nach Gail und Chang-Claude, n=24



4 Diskussion

4.1 Fragestellung der Arbeit

Zwischen Tumorwachstum und verstärkter Gefäßbildung besteht ein Zusammenhang, der in zahlreichen experimentellen Studien untersucht wurde.

Auch zeigen zahlreiche klinische Studien eine Korrelation der Anzahl der Tumorgefäße im Primärtumor, der rezidivfreien Überlebenszeit, der Metastasierungstendenz und der Gesamtüberlebenszeit [Harstrick (2000)].

Die Angiogenese wird über ein komplexes System aus wachstumsinduzierenden und wachstumshemmenden Faktoren reguliert. Zu den fördernden Mediatoren gehören die Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1, die im Serum oder Plasma quantitativ mittels eines Enzymimmunoassays (ELISA) messbar sind.

Von mehreren Forschungsgruppen wurden die Konzentrationen von VEGF und IGF-1 in Serum oder Plasma von Patienten mit malignen Tumorerkrankungen mit denen gesunder Probanden verglichen, besonders häufig untersucht ist dabei das Mammakarzinom.

Hankinson (1998) und Bruning (1995) fanden signifikant höhere IGF-1-Werte im Serum von prämenopausalen Patientinnen mit Mammakarzinom. Peyrat (1993) [in Bohlke (1998)] beschreibt erhöhte Werte auch bei Frauen über 50 Jahren. Bohlke (1998) zeigt erhöhte Serumwerte bei prämenopausalen Patientinnen mit einem duktalem Carcinoma in situ.

Bruning (1995) beschreibt zusätzlich einen erniedrigten IGFBP-3-Spiegel bei Mammakarzinompatientinnen gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe. Yu (1998) fand eine positive Korrelation von einer hohen IGFBP-3-Konzentration und schlechter Prognose, anders, als nach experimentellen Studien zu erwarten wäre. Die Messung dieses Bindungsproteins in der Beobachtung von Mammakarzinompatientinnen scheint von besonderer Bedeutung, da es sich in Brustkrebsgewebe als Hauptbindungsprotein finden lässt [Yu (1998)], seine genaue Rolle bei der Entstehung von Tumoren ist noch weitgehend unbekannt.

Bei Untersuchungen des VEGF zeigen sich dem IGF-1 ähnliche Ergebnisse. Salven (1999) und Yamamoto (1996) fanden erhöhte VEGF-Werte bei Brustkrebspatientinnen gegenüber der Kontrollgruppe, wobei an einem metastasiertem Mammakarzinom erkrankte Patientinnen die höchsten Werte aufweisen.

Guidi (1997) beschreibt erhöhte VEGF-Werte bei Patientinnen mit einem duktalem Carcinoma in situ (DCIS). Salven (1999) konnte dies für DCIS-Patientinnen allerdings nicht bestätigen.

Neben einer malignen Tumorerkrankung finden sich weitere Faktoren wie Ernährungszustand, Body-Mass-Index (BMI), Hormoneinnahme und Stoffwechselkrankheiten wie Diabetes, die einen Anstieg oder Abfall der Wachstumsfaktoren bedingen können.

Die beschriebenen Studien wurden unter Bedingungen erstellt, die einen Einfluss dieser Faktoren weitestgehend minimieren.

Die vorliegende Arbeit dagegen untersucht, ob unter klinischen Routine-Bedingungen, wie sie in der Spezialsprechstunde für Risikopatientinnen vorliegen, die Ergebnisse bestätigt werden können und die Messung der Wachstumsfaktoren eine aussagekräftige Untersuchung mit diagnostischen und gegebenenfalls auch therapeutischen Konsequenzen sein kann.

Es wurde untersucht, ob sich bei Frauen, die aufgrund einer familiären Belastung ein erhöhtes Brustkrebsrisiko aufweisen, bereits primär veränderte VEGF-, IGF-1- und IGFBP 3 Werte im Sinne einer veränderten Risikokonstellation nachweisen lassen. Beobachtet wurde, ob sich im Verlauf mehrerer Monate eine stabile intraindividuelle Wertekonstellation zeigt und sich damit als Kontrollparameter für das mögliche Auftreten einer malignen Entwicklung eignet.

Des weiteren wurde untersucht, ob sich bei den Patientinnen, die im Rahmen einer Mammakarzinompräventionsstudie mit dem Antiöstrogen Toremifen (Fareston®) behandelt werden, ein Unterschied zu den Patientinnen der Kontrollgruppe und eine nachweisbare Veränderung der Werte im Verlauf zeigt und sich damit Ergebnisse früherer Studien bestätigen lassen.

Pollak (1990) und Friedl (1993) beispielsweise beschreiben einen signifikanten Abfall des IGF-1-Spiegels unter Therapie mit dem Antiöstrogen Tamoxifen. Die zytostatische Wirkung könnte möglicherweise über die Beeinflussung des IGF-1 erreicht werden. Pollak (1990) erklärt diesen Abfall des IGF-1 mit einer verringerten Stimulation der Leberzellen durch das Wachstumshormon GH, da dessen Ausschüttung wiederum von Östrogenen stimuliert wird.

4.2 Methodenkritik

Bevor die Ergebnisse dieser Studie interpretiert werden, soll die angewandte Methodik kritisch betrachtet werden.

4.2.1 Berechnung des erhöhten Brustkrebsrisiko

Für das Patientinnenkollektiv wurden Frauen aus der Risikosprechstunde der Charité gewählt. Diesen 106 Frauen ist gemeinsam, dass sie aufgrund von Berechnungen nach den Risikomodellen nach Gail [Gail (1989)] und Chang-Claude [Chang-Claude (1995)] ein erhöhtes Brustkrebsrisiko gegenüber der Normalbevölkerung aufweisen. Es wurde zusätzlich eine Einteilung in low- und high-risk-Gruppen vorgenommen, die der üblicherweise gebrauchten Grenze von 15% nach der Gail-Berechnung folgt.

Es ist zu fragen, inwieweit diese Risikomodelle das tatsächliche relative Risiko angeben.

Ein Vergleich der beiden Modelle zeigt, dass sich die errechneten Risiken um bis zu 23,7 Prozentpunkte unterscheiden. Die Vermutung liegt nahe, dass diese Abweichungen mit der Verwendung unterschiedlicher anamnestischer Daten für die Berechnung zu erklären sind. Während für das Gail-Modell nur die Anzahl der erkrankten Verwandten 1.Grades berücksichtigt wird, fordert das Modell nach Chang-Claude zusätzlich Anzahl sowie Erkrankungsalter auch Verwandter 2.Grades. Dagegen werden für das Modell nach Chang-Claude im Gegensatz zum Modell nach Gail weder Menarchealter noch Alter bei Geburt des ersten Kindes und Anzahl der Biopsien berücksichtigt.

Ein Vergleich der anamnestischen Daten zeigt, dass sich Alter, Menarchealter und Alter bei Geburt des ersten Kindes in der Gruppe der Frauen mit einem nach dem Gail-Modell höheren Risiko von der Gruppe der Frauen mit einem nach dem Chang-Claude-Modell höheren Risiko nicht unterscheiden. Die Anzahl der Biopsien können im Vergleich vernachlässigt werden, da in der Gesamtgruppe nur bei drei Frauen eine Biopsie durchgeführt wurde.

Ein Unterschied zwischen den beiden Gruppen lässt sich in der Familienanamnese erkennen. In der Gruppe der Frauen mit einem nach Gail höheren Risiko liegt die Anzahl der erkrankten Verwandten 1.Grades im Mittel bei 1,78, die Anzahl der Verwandten 2.Grades bei 0,22. In der Gruppe der Frauen mit einem nach Chang-Claude höheren Risiko liegt die Anzahl der Verwandten 1.Grades bei 1 und die Anzahl der Verwandten 2.Grades bei 1,27.

Betrachtet man die anamnestischen Daten der Frauen, bei denen sich die nach beiden Modellen berechneten Risiken um mehr als 10 Prozentpunkte unterscheiden, lassen sich keine Auffälligkeiten gegenüber den anamnestischen Daten der Gesamtgruppe feststellen. Es gibt also keine Konstellation der Anamnesedaten (beispielsweise hohe Anzahl der erkrankten Verwandten 2.Grades bei Kinderlosigkeit oder andere auffällige Kombinationen), bei der eine starke Differenz der nach den beiden Modellen errechneten Risiken zu erwarten wäre. Nach den hier vorliegenden Daten ist folglich sowohl die Anwendung nur eines der Risikomodelle als auch die Verwendung der errechneten Risiken zur Einteilung in Risikogruppen kritisch zu beurteilen.

Die Einteilung der familiär belasteten Frauen in low- und high-risk-Gruppen ist problematisch, da der Wert von 15% des Risikos nach der Gail-Berechnung willkürlich festgelegt wurde. Die signifikant höheren VEGF-Werte in der Gruppe der Frauen mit einem unter 15% berechneten Risiko gegenüber der Gruppe der Frauen mit einem über diesem Wert liegenden Risiko können als weiterer Hinweis zu werten sein, dass diese Einteilung nicht sinnvoll ist.

Es stellt sich die Frage, wie die Charakterisierung des individuell erhöhten Risikos optimiert und standardisiert werden kann und inwieweit eine derartige Einteilung Konsequenzen in diagnostischer und therapeutischer Hinsicht haben könnte.

4.2.2 Messung von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3

In der vorliegenden Arbeit wurden die untersuchten Parameter mittels eines ELISA-Sandwich-Assays gemessen. Dieses Verfahren ist für Routineuntersuchungen geeignet, da es einfach und zeitsparend eingesetzt werden kann.

Für die Untersuchung des Serum-VEGF wurde ein Assay zur Messung der biologisch aktiven Form VEGF₁₆₅ verwendet.

Während der Aufbereitung der Proben zur Messung des IGF-1 wird der Wachstumsfaktor von seinen Bindungsproteinen gelöst und dann bestimmt. Diese Methode ist nicht unumstritten. Von Janssen wird daran Kritik geübt, da die Messung des ursprünglich gebundenen IGF-1 keine Aussage über die Konzentration an freiem IGF-1 mache. Er bezieht sich dabei auf die „free hormone hypothesis“, nach der nur durch Messung der Konzentration der freien Form eines Modulators seine biologische Aktivität beschreibe [Janssen (1999)].

Von anderen Autoren wird aber die Messung des totalen IGF-1 als aussagekräftig beschrieben [Juul (1997 [b]), Zapf (1997)] und für viele Studien verwendet. Daher kann

sie für die vorliegende Untersuchung als angemessen betrachtet werden. Kritisch ist dennoch, inwieweit der Serum-Spiegel der gemessenen Faktoren die Konzentration im Gewebe und damit an ihrem Wirkort zeigt.

Außerdem wird diskutiert, ob die Messung der Wachstumsfaktoren im Serum zu aussagekräftigen Ergebnissen führt, oder ob sich Plasma als Untersuchungsmaterial besser eignet. Dazu gibt es gegensätzliche Meinungen. Ein laborinterner Vergleich von Plasma und Serum hat allerdings gezeigt, dass die Korrelation von Plasma und Serum nahe 1 ist und damit für den inter- und intraindividuellen Wertevergleich als gleichwertig betrachtet werden kann.

Für IGF-1 und IGFBP-3 ist ein konstanter Spiegel im Tagesverlauf beschrieben [Juul (1994 [b]), Altwein (1997)], die Blutabnahme muss daher zu keiner bestimmten Tageszeit durchgeführt werden.

Auch ist bei der Verlaufsbeobachtung in der Routine keine sehr genaue Einhaltung von bestimmten Zeitabständen notwendig, da die IGF-1-Konzentration über mindestens sechs Wochen stabil bleibt [Hankinson (1998)]. Unregelmäßigkeiten von mehreren Monaten, wie sie in der vorliegenden Studie als Ausdruck des Patientenverhaltens vorkommen, sind allerdings für eine genaue Beobachtung einer möglichen Veränderung nachteilig.

Bei der Erhebung der Daten trat die Frage auf, inwieweit berücksichtigt werden muss, in welcher Zyklusphase sich die prämenopausalen Frauen bei der Blutabnahme befinden. Für das IGF-1 gibt es unterschiedliche Auffassungen. So beschreibt Juul (1997 [a]) eine geringe, aber signifikante Erhöhung in der Lutealphase gegenüber der Proliferationsphase, während andere Studien keine Unterschiede zeigen [Wang (1995), van Dessel (1996)]. Der IGFBP-3-Spiegel zeigt keine Zyklusabhängigkeit [Juul (1997 [a])].

Für VEGF zeigten sich bei der Untersuchung von gesunden Frauen ohne anamnestische Risiken signifikante Unterschiede zwischen der prä-, peri- und postovulatorischen Phase [Götze, Blohmer (2002)]. Da sich die Unterschiede in einem Bereich von 20-30 pg/ml bewegen, scheint ihre Bedeutung für diese Arbeit in Anbetracht der Streubreite der absoluten Werte in einem Bereich von etwa 1000 pg/ml als unbedeutend.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Bis auf einen Unterschied der IGF-1-Werte zwischen prä- und postmenopausalen Frauen konnten für keinen der drei untersuchten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Subgruppen festgestellt werden. Auch zwischen der Gruppe, die mit Toremifen behandelt wurde und der Kontrollgruppe war kein Unterschied nachweisbar. Diese Ergebnisse widersprechen den Ergebnissen anderer Arbeiten, bei denen erhöhte Werte der Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1 und erniedrigte Werte des Bindungsproteins IGFBP-3 in Serum oder Plasma von Patientinnen, die an einem Mammakarzinom oder einer Präkanzerose erkrankt waren, festgestellt wurden.

Für die untersuchten Parameter, insbesondere für IGF-1, sind eine Vielzahl an Faktoren beschrieben worden, die ihre Serum-Konzentration beeinflussen. Die Höhe des IGF-1 im Serum wird von Größe und Body-Mass-Index (BMI) beeinflusst [Juul (1994 [a])], außerdem zeigt sich ein signifikanter Abfall im Alter [Juul (1997 [a])]. Auch nimmt der IGF-1-Spiegel nach der Menopause deutlich ab, wahrscheinlich aufgrund des erniedrigten Östrogen-Spiegels [Juul (1997 [a])]. Diese Abhängigkeit von Alter und Menopausenstatus konnte mit einem signifikanten Unterschied zwischen prä- und postmenopausalen Frauen bestätigt werden ($p < 0,05$).

Möglicherweise kann dadurch erklärt werden, warum bei dem Vergleich zwischen den Hauptgruppen Ergebnisse zustande kamen, die widersprüchlich zu früheren Untersuchungen sind. So fanden sich höhere IGF-1-Werte in der Gruppe der gesunden, familiär belasteten Frauen gegenüber der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose und Mammakarzinom. Der Altersmedian in der Gruppe der gesunden Frauen lag bei 45 Jahren, der Anteil der prämenopausalen Frauen war höher als der Anteil der postmenopausalen Frauen ($n=39/ n=26$). In der Gruppe der Patientinnen mit einer Präkanzerose lag der Altersmedian bei 54, in der Gruppe der Patientinnen mit Mammakarzinom bei 56 Jahren. In der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose waren etwas mehr postmenopausale Frauen ($n=17/ n=13$).

Betrachtet man die Zusammensetzung der Toremifen- und der Kontrollgruppe genau, fällt auf, dass Altersmedian und Körpermaße zwar sehr ähnlich sind, in der Kontrollgruppe aber weniger prämenopausale als postmenopausale Frauen sind ($n=4/n=8$). Die Toremifengruppe ist bezüglich des Menopausenstatus gleichmäßig verteilt. Auch wenn der Unterschied klein scheint, könnte doch eine Erniedrigung der IGF-1-Werte durch Toremifen, wie sie in anderen Studien beschrieben wird, durch die niedrigeren Werte der postmenopausalen Frauen in der Kontrollgruppe verschleiert

werden.

Um eine genaue Aussage über Unterschiede machen zu können, ist es erforderlich, größere Gruppen zu untersuchen, die gleichmäßig bezüglich Alter, Körpermasse, bzw. BMI und Menopausenstatus verteilt sind.

Ein Vergleich mit Normalwerten konnte für IGF-1 und das Bindungsprotein IGFBP-3 nicht durchgeführt werden, da keine Werte aus einem gesunden familiär unbelasteten Patientinnenkollektiv im eigenen Labor erstellt wurden. Die Normalwerte des ELISA-Herstellers sind teilweise geschlechts- und altersunspezifisch und daher zu ungenau, um eine Aussage über Unterschiede machen zu können. Normalwerte anderer Studien sind methodisch nicht immer identisch und daher für einen genauen Vergleich schwierig zu verwenden.

Auch die VEGF-Konzentration wird von unterschiedlichen Faktoren beeinflusst. So findet sich beispielsweise eine Erhöhung der VEGF-Konzentration bei Krankheiten wie proliferierende Retinopathie, Psoriasis und Rheumatoider Arthritis [Claffey (1996)]. Anders als das IGF-1 zeigt VEGF dagegen keine große Abhängigkeit vom Alter [Yamamoto (1996)].

Die Untersuchung von 239 gesunden Frauen ohne Hormoneinnahmen in dem selben Labor zeigt keinen Einfluss des Menopausenstatus [Götze, Blohmer (2002)]. Die Ergebnisse des Vergleiches zwischen prä- und postmenopausalen Frauen dieser Untersuchung können dies bestätigen.

Eine interessante Frage ist, ob sich die Konzentration der Wachstumsfaktoren im Laufe einer Brustkrebserkrankung ändert. Möglicherweise hängt ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Brustkrebs mit einem individuell hohen IGF-1-Spiegel zusammen, der beispielsweise von der Kalorienzufuhr im Kindesalter abhängt. Dafür spricht, dass das Krebsrisiko bei hohem Geburtsgewicht [Michels (1996)] und hoher Kalorienzufuhr im Kindesalter [Frankel (1998)] erhöht ist. Vielleicht ist dieser Zusammenhang über den IGF-1-Spiegel zu erklären. Es zeigt sich außerdem, dass sich nach Entfernung eines Tumors die IGF-1-Werte nicht ändern [Bruning (1995)]. Auch zeigt eine Chemotherapie wenig Auswirkungen auf die Höhe des IGF-1-Spiegels [Peyrat (1998)]. Dies spricht gegen eine Abhängigkeit des IGF-1 von der Tumormasse, sondern für einen individuellen Wert.

VEGF dagegen scheint direkt von der Tumormasse abzuhängen, so steigen die Werte mit Größe des Tumors und sinken nach einer Operation [Yamamoto (1996)].

4.4 Kann eine Messung der Wachstumsfaktoren in der Klinik sinnvoll eingesetzt werden?

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass ein einzelner Serumwert der untersuchten Wachstumsfaktoren keine Aussage über ein individuelles Risiko oder eine beginnende klinisch und bildgebend okkulte Erkrankung zulässt. Aufgrund der Streubreite der Faktoren kann ein Vergleich mit einem Normalwert, der als Mittelwert eines gesunden Kollektivs erstellt wurde, zur Abschätzung eines individuellen Brustkrebsrisikos bzw. zur Frühdiagnostik nicht eingesetzt werden. Von Nutzen scheint dagegen eher die Erstellung eines individuellen Normwertes zu sein, der verwendet werden könnte, um mögliche Veränderungen der Konzentration über einen längeren Zeitraum zu beobachten. Es bleibt abzuwarten, inwiefern eine Veränderung der Werte therapeutische Konsequenzen haben könnte.

Die Ergebnisse der Verlaufsbeobachtungen zeigen, dass die Konzentrationen von VEGF und IGF-1 intraindividuell relativ konstant bleiben, das Bindungsprotein IGFBP-3 dagegen inkonstant ist. Es finden sich allerdings auch für VEGF und IGF-1 einige individuelle Konzentrationsverläufe, bei denen die Werte stark schwanken und aus der klinischen Beobachtung der Patientinnen nicht ersichtlich ist, welchen Grund diese Schwankung haben könnte. Um eine genaue Aussage darüber machen zu können, ob sich eine Konzentrationsänderung vor der Diagnose eines Tumors durch herkömmliche Untersuchungen zeigt, müsste ein großes Patientinnenkollektiv regelmäßig und in geringen Zeitabständen beobachtet werden, um in Langzeitverlaufsuntersuchungen sagen zu können, ob sich bei Entwicklung eines Mammakarzinoms die Serum-Konzentrationen vor Diagnosestellung mit bildgebenden Verfahren geändert haben. Dies wäre allerdings nur in Screeningpopulationen möglich.

Die Ergebnisse in der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose deuten allerdings eher darauf hin, dass erhöhte Konzentrationen erst in einem fortgeschritten Stadium nachweisbar sind. Es bleibt abzuwarten, ob Verfahren entwickelt werden, die bereits geringfügige Veränderungen messen können.

Zur Zeit scheint die Messung von Serum-Konzentrationen der Wachstumsfaktoren VEGF und IGF-1 sowie des Bindungsproteines IGFBP-3 in einer klinischen Situation, wie sie bei der Untersuchung von einem Kollektiv aus der Sprechstunde für Frauen mit erhöhtem Brustkrebsrisiko vorlag, keine aussagekräftige Methode zur individuellen Risikospezifizierung und zur Früherkennung des Mammakarzinoms zu sein.

5 Zusammenfassung

Das Mammakarzinom gehört zu den häufigsten Krebserkrankungen der Frau. Die Prognose einer Brustkrebserkrankung richtet sich nach den Stadien der TNM-Klassifikation, dabei ist die Wahrscheinlichkeit eines fortgeschrittenen Stadiums bei später Diagnosestellung erhöht. Daher ist insbesondere die Früherkennung der Erkrankung Gegenstand klinischer Forschung. Das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, liegt in der Normalbevölkerung bei 7-10%. Eine individuelle Erhöhung des Risikos findet sich bei familiärer Belastung bezüglich Brustkrebs, sowie einer früheren Erkrankung an einer Präkanzerose wie des Carcinoma ductale in situ (DCIS), des Carcinoma lobulare in situ (CLIS) und der atypischen ductalen Hyperplasie (ADH).

Besonderes Augenmerk in der Krebsforschung liegt zur Zeit auf dem Zusammenhang zwischen Tumorwachstum und der Bildung neuer Gefäße, der Angiogenese. Diese Neubildung von Kapillaren ist in hohem Maße von der Ausschüttung bestimmter Wachstumsfaktoren abhängig, von denen der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) aufgrund seiner Endothelspezifität der mitogenen Wirkung große Bedeutung besitzt.

Aber auch der in fast allen Geweben vorkommende und für viele physiologische Prozesse entscheidende Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) und seine Bindungsproteine (IGFBP-1 bis IGFBP-7) scheinen bei der Tumorentwicklung eine wichtige Rolle zu spielen.

Zahlreiche klinische Studien beschäftigen sich daher mit dem Vergleich von Serum- oder Plasmakonzentrationen an VEGF, IGF-1 und seiner Bindungsproteine zwischen Krebspatienten und Kontrollgruppen. Dabei sind für Brustkrebspatientinnen erhöhte VEGF- und IGF-1-Konzentrationen und erniedrigte IGFBP-3-Konzentrationen beschrieben. Auch für Patientinnen mit einer DCIS-Erkrankung sind erhöhte VEGF-Konzentrationen gefunden worden.

Diese Untersuchung beschäftigt sich mit der Wertigkeit einer Messung der genannten Wachstumsfaktoren zur regelmäßigen Untersuchung von Brustkrebsrisikopatientinnen in der Klinik.

Dafür wurde ein Kollektiv von 106 Frauen untersucht, die entweder aufgrund einer familiären Belastung oder der Erkrankung an einer Präkanzerose in der Sprechstunde der Frauenklinik der Charité behandelt bzw. beraten wurden. Für einen

Vergleich innerhalb der Hauptgruppen „familiäre Belastung“ und „Präkanzerose“ wurde eine Einteilung in Subgruppen nach Menopausenstatus, in der Gruppe der familiär belasteten Frauen zusätzlich nach Höhe des berechneten Risikos und in der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose zusätzlich nach Antiöstrogenbehandlung und Familienanamnese bezüglich Brustkrebs vorgenommen. Als Kontrollgruppen dienten ein Kollektiv von Mammakarzinompatientinnen sowie ein Normalkollektiv aus 234 gesunden Frauen ohne ersichtliche Risiken.

Die VEGF, IGF-1 und IGFBP-3-Konzentrationen wurden mittels eines Enzyme-linked Immunoassays (ELISA) im Serum gemessen und verglichen.

Dabei fanden sich für VEGF und IGFBP-3 keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Haupt- und Subgruppen ($p > 0,05$). Für IGF-1 konnte eine signifikante Abhängigkeit der Serumkonzentration vom Menopausenstatus bestätigt werden ($p < 0,001$, bzw. $p = 0,001$ in der Gruppe der Frauen mit familiärer Belastung und $p = 0,003$ in der Gruppe der Patientinnen mit Präkanzerose), die übrigen Vergleiche zeigten keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

Auch der Vergleich zwischen den VEGF-Konzentrationen von Risikopatientinnen und dem Normalkollektiv wies keinen signifikanten Unterschied aus ($p > 0,05$).

Um die intraindividuelle Konstanz der Werte über einen längeren Zeitraum zu prüfen, wurden 34 Frauen, von denen mehr als ein Serum-Wert vorlag, untersucht. Dabei konnte eine intraindividuelle Streubreite der VEGF-Werte im Mittel von 115 pg/ml (Median 118,5 pg/ml, Range 2-310 pg/ml), der IGF-1-Werte im Mittel von 36 ng/ml (Median 27,5 ng/ml, Range 0-134 ng/ml) und der IGFBP-3-Werte im Mittel von 1792 ng/ml (Median 1587 ng/ml, Range 1-4074 ng/ml) festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass aufgrund der starken interindividuellen Streuung der VEGF-, IGF-1- und IGFBP-3-Werte eine Kontrolle der Serumkonzentration nur nach Bestimmung eines individuellen Referenzwertes von klinischem Nutzen sein kann.

Zur Zeit scheint die Messung von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3 zur Kontrolle von Risikopatientinnen wenig aussagekräftig zu sein.

Schlagworte: Mammakarzinom, Angiogenese, VEGF, IGF-1, IGFBP-3

6 Abkürzungen

ADH	Atypische duktale Hyperplasie
BCDDP	Breast Cancer Detection Demonstration Projekt Breast
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BMI	Body-Mass-Index
CASH	Cancer and Steroid Hormone Study
CLIS	Lobuläres Carcinoma in situ
DCIS	Duktales Carcinoma in situ
ELISA	Enzyme-linked Immunoassay
FLK-1 (KDR)	fetal liver kinase-1 (kinase insert domain receptor)
FLT-1	fms-like tyrosine kinase
GH	Growth Hormone
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP-3	Insulin-like growth factor binding proteine 3
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
PDGF	Platelet derived growth factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TGF α , TGF β	Transforming Growth Factor α und β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VPF	Vascular permeability factor

7 Anhang

7.1 Datenüberblick

7.1.1 Serum-Konzentrationen von VEGF, IGF-1 und IGFBP-3

Tab. 6: Serum-Konzentrationen von VEGF

VEGF (pg/ml)		Mittelwert	Median	Standardabweichung
Familiäre Belastung	Gesamt (n=65)	314	277	190
	Prämenopausal (n=39)	303	252	174
	Postmenopausal (n=26)	326	297	216
	low risk (n=14)	416	372	168
	high risk (n=46)	294	248	192
Präkanzerose	Gesamt (n=30)	325	288	159
	Prämeno. (n=13)	383	394	176
	Postmeno. (n=17)	282	272	135
	Mit familiärer Belastung (n=10)	333	281	149
	Ohne familiäre Belastung (n=20)	322	310	168
	Toremifen (n=18)	365	387	180
	Kontrolle (n=12)	266	258	103
Mammakarzinom	n=11	367	465	262

Tab. 7: Serum-Konzentrationen von IGF-1

IGF-1 (ng/ml)		Mittelwert	Median	Standardabweichung
Familiäre Belastung	Gesamt (n=65)	180	179	54
	Prämenopausal (n=39)	198	191	53
	Postmenopausal (n=26)	152	143	43
	Low risk (n=14)	162	162	44
	High risk (n=46)	176	179	50
Präkanzerose	Gesamt (n=30)	156	152	50
	Prämeno. (n=13)	175	162	56
	Postmeno. (n=17)	142	143	43
	Mit familiärer Belastung (n=10)	160	149	47
	Ohne familiäre Belastung (n=20)	155	153	53
	Toremifen (n=18)	145	149	27
	Kontrolle (n=12)	173	157	71
Mammakarzinom	n=11	150	133	64

Tab. 8: Serum-Konzentrationen von IGFBP-3

IGFBP-3 (ng/ml)		Mittelwert	Median	Standardabweichung
Familiäre Belastung	Gesamt (n=65)	4034	3935	1232
	Prämenopausal (n=39)	4029	3902	1292
	Postmenopausal (n=26)	4038	3955	1161
	low risk (n=14)	3616	3385	1183
	high risk (n=46)	4176	3983	1271
Präkanzerose	Gesamt (n=30)	4299	4059	1283
	Prämeno. (n=17)	4122	4094	1216
	Postmeno. (n=16)	4434	4023	1261
	Mit familiärer Belastung (n=10)	3664	3855	963
	Ohne familiäre Belastung (n=20)	4616	4340	1324
	Toremifen (n=18)	4527	4116	1421
	Kontrolle (n=12)	3957	4021	1006
Mammakarzinom	n=11	4130	3921	1579

7.1.2 Vergleich der Gruppen

Tab. 9: Vergleich der Hauptgruppen

VEGF p-Wert	Familiäre Belastung	Präkanzerose	Mammakarzinom
Familiäre Belastung (fam.Bel.)	-	n.s.	n.s.
Präkanzerose (Präkanz.)	n.s.	-	n.s.
Mammakarzinom	n.s.	n.s.	-
IGF-1 p-Wert	Familiäre Belastung	Präkanzerose	Mammakarzinom
Familiäre Belastung (fam.Bel.)	-	0,019 (fam.Bel.> Präkanz.)	n.s.
Präkanzerose (Präkanz.)	0,019 (fam.Bel.> Präkanz.)	-	n.s.
Mammakarzinom	n.s.	n.s.	-
IGFBP-3 p-Wert	Familiäre Belastung	Präkanzerose	Mammakarzinom
Familiäre Belastung (fam.Bel.)	-	n.s.	n.s.
Präkanzerose (Präkanz.)	n.s.	-	n.s.
Mammakarzinom	n.s.	n.s.	-

Tab. 10: Vergleich innerhalb der Hauptgruppe familiäre Belastung

VEGF p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
	low risk/ high risk	0,011 (low > high)
IGF-1 p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	0,001 (prä.> post.)
	low risk/ high risk	n.s.
IGFBP-3 p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
	low risk/ high risk	n.s.

n.s.= nicht signifikant

Tab. 11: Vergleich innerhalb der Hauptgruppe Präkanzerose

VEGF p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
	Mit/ ohne familiäre Belastung	n.s.
	Toremifen/ Kontrolle	n.s.
IGF-1 p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	0,003 (prä.> post.)
	Mit/ ohne familiäre Belastung	n.s.
	Toremifen/ Kontrolle	n.s.
IGFBP p-Wert	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
	Mit/ ohne familiäre Belastung	n.s.
	Toremifen/ Kontrolle	n.s.

Tab. 12: Vergleich von Subgruppen unterschiedlicher Hauptgruppen

VEGF p-Wert		
Gesamt	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
prämenopausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	n.s.
postmenonpausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	n.s.
IGF-1 p-Wert		
Gesamt	Prä.-/ postmenopausal	<0,001 (prä.> post.)
prämenopausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	0,032 (fam.Bel.> Präkanz.)
postmenonpausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	n.s.
IGFBP-3 p-Wert		
Gesamt	Prä.-/ postmenopausal	n.s.
prämenopausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	n.s.
postmenonpausal	Familiäre Belastung/ Präkanzerose	n.s.

n.s.= nicht signifikant

7.1.3 Vergleich der VEGF-Werte mit einem Normalkollektiv

Tab. 13: Vergleich der VEGF-Werte mit einem Normalkollektiv

Normal gesamt (n=234)	Prä./ postmenopausal	n.s.
prämenopausal (n=135)	Normal/	n.s.
	fam.Bel.+Präkanz.	
	Normal/ fam.Bel.	
	Normal/ Präkanz.	n.s.
postmenopausal (n=99)	Normal/	n.s.
	fam.Bel.+Präkanz.	
	Normal/ fam.Bel.	
	Normal/ Präkanz.	n.s.

n.s.= nicht signifikant

7.1.4 Vergleich der VEGF-Werte mit Tumorpatientinnen

Tab. 14: Vergleich der VEGF-Werte mit Tumorpatientinnen

Benigne Tumoren (n=47)	Mittelwert=348 pg/ml	
	Familiäre Belastung	n.s.
	Präkanzerose	n.s.
Maligne Tumoren (n=53)	Mittelwert=442 pg/ml	
	Familiäre Belastung	<0,001 (mal.Tum.>fam.Bel.)
	Präkanzerose	<0,001 (mal.Tum.>Präkanz.)

n.s.= nicht signifikant

7.2 Anamnestische Daten zum Vergleich der Risikomodelle

Tab. 15: Gesamtgruppe (n=24)

Patientin	Alter	1.Grad	2.Grad	Menarchealter	Alter 1.Geburt	Biopsien	GAIL	Chang-Claude	Differenz
Mittelwert	42,9	1,3	0,9	12,9	23,1	0,2	20,1	24,5	9,6
1	45	1	1	12	22	0	15,1	24,2	9,1
2	40	1	1	13	22	0	18,3	23	4,7
3	56	2	0	14	32	0	20,2	24,8	4,6
4	41	1	1	13	25	0	18,6	34,2	15,6
5	66	3	0	15	24	1	27,4	20,3	7,1
6	33	1	1	13	n	0	19,2	29	9,8
7	44	1	1	11	n	0	19,7	28	8,3
8	45	0	2	14	15	0	6,4	10,7	4,3
9	30	2	0	12	n	0	19,3	12,8	6,5
10	48	1	2	11	28	0	18,8	24,2	5,4
11	36	0	3	12	n	0	11,3	22,4	11,1
12	48	1	1	12	24	1	19,8	40	20,2
13	51	3	0	15	20	0	28,7	43,2	14,5
14	32	0	2	14	n	0	10,4	20	9,6
15	37	1	2	16	21	0	17,1	29	11,9
16	40	1	1	14	n	0	17,3	41	23,7
17	57	1	1	13	n	0	14,9	12,8	2,1
18	56	3	0	11	26	0	27,3	24,2	3,1
19	34	1	0	12	23	0	18,7	12,8	5,9
20	30	1	0	12	n	0	19,3	15,8	3,5
21	30	1	1	13	n	0	19,3	34,6	15,3
22	36	2	1	12	18	0	40,1	34,7	5,4
23	51	2	0	13	n	0	27,3	15	12,3
24	44	1	0	12	24	2	28	10,4	17,6

n= nullipara

Tab. 16: Gruppe der Frauen mit einem nach dem Gail-Modell berechneten höheren Risiko (n=9)

Patientin	Alter	1.Grad	2.Grad	Menarchealter	Alter 1.Geburt	Biopsien	Gail	Chang-Claude	Differenz
Mittelwert	44,9	1,8	0,2	12,4	23	0,3	24,7	17,6	7,1
5	66	3	0	15	24	1	27,4	20,3	7,1
9	30	2	0	12	n	0	19,3	12,8	6,5
17	57	1	1	13	n	0	14,9	12,8	2,1
18	56	3	0	11	26	0	27,3	24,2	3,1
19	34	1	0	12	23	0	18,7	12,8	5,9
20	30	1	0	12	n	0	19,3	15,8	3,5
22	36	2	1	12	18	0	40,1	34,7	5,4
23	51	2	0	13	n	0	27,3	15	12,3
24	44	1	0	12	24	2	28	10,4	17,6

Tab. 17: Gruppe der Frauen mit einem nach dem Chang-Claude-Modell berechneten höheren Risiko (n=15)

Patientin	Alter	1.Grad	2.Grad	Menarchealter	Alter 1.Geburt	Biopsien	Gail	Chang-Claude	Differenz
Mittelwert	41,7	1	1,3	13,1	23,2	0,1	17,3	28,6	11,2
1	45	1	1	12	22	0	15,1	24,2	9,1
2	40	1	1	13	22	0	18,3	23	4,7
3	56	2	0	14	32	0	20,2	24,8	4,6
4	41	1	1	13	25	0	18,6	34,2	15,6
6	33	1	1	13	n	0	19,2	29	9,8
7	44	1	1	11	n	0	19,7	28	8,3
8	45	0	2	14	15	0	6,4	10,7	4,3
10	48	1	2	11	28	0	18,8	24,2	5,4
11	36	0	3	12	n	0	11,3	22,4	11,1
12	48	1	1	12	24	1	19,8	40	20,2
13	51	3	0	15	20	0	28,7	43,2	14,5
14	32	0	2	14	n	0	10,4	20	9,6
15	37	1	2	16	21	0	17,1	29	11,9
16	40	1	1	14	n	0	17,3	41	23,7
21	30	1	1	13	n	0	19,3	34,6	15,3

n= nullipara

Tab. 18: Gruppe der Frauen mit einer Differenz der nach beiden Modellen berechneten Risiken von über 10 Prozentpunkten (n=9)

Patientin	Alter	1.Grad	2.Grad	Menarchealter	Alter 1.Geburt	Biopsien	Gail	Chang-Claude	Differenz
Mittelwert	42	1,2	1	13,3	22,8	0,3	20,8	29,9	15,8
23	51	2	0	13	n	0	27,3	15	12,3
24	44	1	0	12	24	2	28	10,4	17,6
4	41	1	1	13	25	0	18,6	34,2	15,6
11	36	0	3	12	n	0	11,3	22,4	11,1
12	48	1	1	12	24	1	19,8	40	20,2
13	51	3	0	15	20	0	28,7	43,2	14,5
15	37	1	2	16	21	0	17,1	29	11,9
16	40	1	1	14	n	0	17,3	41	23,7
21	30	1	1	13	n	0	19,3	34,6	15,3

n= nullipara

8 Literatur

1. Aiello (1995): Aiello LP, Pierce EA, Foley ED, Takagi H, Chen H, Riddle L, Ferrara N, King GL, Smith LE: Suppression of retinal neovascularization in vivo by inhibition of vascular endothelial growth factor using soluble VEGF-receptor chimeric proteins. *Proc Natl Acad Sci* 1995, 92 (23), S.10457-10461
2. Altwein (1997): Altwein F: Altersabhängige Referenzbereiche im Kindes- und Jugendalter für IGF-1, IGFBP-3 und IGFBP-1 und Methodenvergleich für die IGF-1 und IGFBP-3-Bestimmungen mittels der IRMA- und ELISA-Technik. Inaugural-Dissertation, Berlin, 1997
3. Arteaga (1989): Arteaga CL, Kitten L, Coronado EB, Jacobs S, Kull FC Jr., Allred DC, Osborne CK: Blockade of the type 1 somatomedin receptor inhibits growth of human breast cancer cells in athymic mice. *J Clin Invest* 1989, 84 (5), S.1418-1423
4. Baumann (1992): Baumann TM: Aspekte der Früherkennungsuntersuchungen beim Mammakarzinom. Inaugural-Dissertation, Tübingen, 1992
5. Becker (2001): Becker N: Entwicklung der Inzidenz und Mortalität an Brustkrebs. *Der Radiologe* 2001, 41, S.337-343
6. Bohlke (1998): Bohlke K, Cramer DW, Trichopoulos D, Mantzoros CS: Insulin-like growth factor-1 in relation to premenopausal ductal carcinoma in situ of the breast. *Epidemiology* 1998, 9, S.570-573
7. Brown (1995): Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ : Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Human Pathol* 1995, 26 (1), S.86-91
8. Bruning (1995): Bruning PF, Van Doorn J, Bonfrér JMG, Van Noord PAH, Korse CM, Linders C, Hart AAM: Insulin-like growth-factor-binding protein 3 is decreases in early-stage operable pre-menopausal breast cancer. *Int J Cancer* 1995, 62, 266-270
9. Bruns (1994): Bruns A: Veränderungen im endokrinen System bei postmenopausalen Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom unter einer Behandlung mit Tamoxifen bzw. Toremifene. Inaugural-Dissertation, Bonn, 1994
10. Chang-Claude (1994): Chang-Claude J, Eby N, Becher H: Die Bedeutung genetischer Faktoren für die Entstehung von Brustkrebs. *Zentralblatt für Gynäkologie* 1994, 116, S.660-669
11. Chang-Claude (1995): Chang-Claude J, Becher H, Hamann U, Schroeder-Kurth T: Risikoabschätzung für das familiäre Auftreten von Brustkrebs. *Zentralblatt für Gynäkologie* 1995, 117, S.423-434
12. Claffey (1995): Claffey KP, Senger DR, Spiegelman BM: Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion and biological function of VPF/ VEGF. *Biochem Biophys Acta* 1995, 1246 (1), S.1-9
13. Claffey (1996): Claffey KP, Robinson GS: Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer*

- Metastasis Rev 1996, 15 (2), S.165-176
14. Claus (1994): Claus EB, Risch NJ, Thompson WD: Autosomal dominant inheritance of early-onset breast cancer. Implications for risk prediction. Cancer 1994, 73 (3), S.643-651
 15. Delozier (1986): Delozier T, Julien JP, Juret P: Adjuvant tamoxifen in postmenopausal breast cancer: preliminary results of a randomized trial . Breast Cancer Res Treat 1986, 7, S.105-110
 16. Dirix (1996): Dirix LY, Vermeulen PB, Hubens G, Benoy I, Martin M, De Pooter C, van Oosterom AT: Serum basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor and tumor growth kinetic in advanced colorectal cancer. Ann Oncol 1996, 7, S.843-848
 17. Dubois (1995): Dubois V, Coussi D, Schonne E, Remacle C, Trouet A: Intracellular levels and secretion of insulin-like growth-factor-binding proteins in MCF-7/6, MCF-7/AZ and MDA-MB-231 breast cancer cells. Eur J Biochem 1995, 232, 47-53
 18. Dvorak (1991): Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, van de Water L, Senger DR: Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: Concentration in tumor blood vessels. J Exp Med 1991, 174, S.1275-1278
 19. Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group (1992): Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic or immune therapy. Lancet 1992, 339, S.1-15,71-85
 20. Easton (1995): Easton DF, Ford D, Bishop DT and the Breast Cancer Linkage Consortium: Breast and ovarian cancer incidence in BRCA 1-mutation carriers. Am J Hum Genet 1995, 56, S.265-271
 21. Ellis (1998): Ellis MJ, Jenkins S, Hanfelt J, Redington ME, Taylor M, Leek R, Siddle K, Harris A: Insulin-like growth factors in human breast cancer. Breast Cancer Res Treat 1998, 52, S.175-184
 22. Ernhardt (1999): Ernhardt B, Blohmer JU, Schuerenkaemper P, Lichtenegger W: Correlation of vascular endothelial growth factor with pathohistological parameters in breast tumors, preliminary results 1999
 23. Fiedler (2001): Fiedler W, Gehling U, Mende T, Hossfeld DK: Neoangiogenese und Tumorwachstum, Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze. Deutsches Ärzteblatt 2001, Jg.98, 21, S.1392-1394
 24. Fisher (1986): Fisher B, Redmond C, Brown A: Adjuvant chemotherapy with and without tamoxifen in the treatment of primary breast cancer: 5-year results from the national Surgical Breast and Bowel Project trial. J Clin Oncol 1986, 4, S.459-471
 25. Folkman und Shing (1992): Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. J Biol Chem 1992, 267(16), S.10931-10934
 26. Folkman (1992): Folkman J: The role of angiogenesis in tumor growth. Semin cancer Biol 1992, 3 (2), S.65-71
 27. Folkman (1994): Folkman J: Angiogenesis and breast cancer. J Clin Oncol 1994, 12/3, S.441-443

28. Folkman (1995): Folkman J: Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med* 1995, 1, S.27-31
29. Folkman (1996): Folkman J Fighting cancer by attacking its blood supply. *Scientific American* 1996, S.116-119
30. Franceschi (1998): Franceschi S, Levi F, La Vecchia C, Randimbiso L, Te VC: Second cancers following *in situ* carcinoma of the breast. *Int J Cancer* 1998, 77, S.392-395
31. Frankel (1998): Frankel S, Gunnell DJ, Peters TJ, Maynard M, Davey-Smith G: Childhood energy intake and adult mortality from cancer: The Boyd Orr cohort study. *BMJ* 1998, 316 (7130), S.499-504
32. Friedl (1993): Friedl A, Jordan VC, Pollak M: Suppression of serum insulin-like growth factor-1 levels in breast cancer patients during adjuvant tamoxifen therapy. *Eur J Cancer* 1993, 29A, S.1368-1372
33. Frykberg (1999): Frykberg ER: Lobular Carcinoma in situ of the breast. *Breast J* 1999, 5, S.296-303
34. Gail (1989): Gail MH, Brinton LA, Byar DP, Corle DK, Green SB, Schairer C, Mulvihill JJ: Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Natl Cancer Inst* 1989, 81, S.1879-1886
35. Gasparini (1997): Gasparini G, Toi M, Gion M, Verderio P, Dittadi R, Hanatani M, Matsubara I, Vinante O, Bonoldi E, Boracchi P, Gatti C, Suzuki I, Tominaga T: Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89, S.139-147
36. Gasparini (1999): Gasparini G: The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia. *Drugs* 1999, 58 (1), S.17-38
37. Götze F, Blohmer JU (2002): unveröffentlichte Daten im Druck, Promotion Götze F: Angiogenese und Endokrinium - Erstellung von Normwerten des VEGF/s-VEGF-R2 (KDR)-Systems bei Frauen unter Berücksichtigung von Zyklusphasen und Menopausenstatus (medizinische Dissertation)
38. Goldman (1998): Goldman CK, Kendall RL, Cabrera G, Soroceanu L, Heike Y, Gillespie GY, Siegal GP, Mao XZ, Bett AJ, Huckle WR, Thomas KA, Curiel DT: Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate. *Proc nat Acad Sci* 1998, 95, S.8795-8800
39. Guidi (1997): Guidi AJ, Schnitt SJ, Fischer L, Tognazzi K, Harris JR, Dvorak HF, Brown LF: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) expression and angiogenesis in patients with ductal carcinoma in situ of the breast. *Cancer* 1997, 80 (10), S.1945-1953
40. Guvakova (1997): Guvakova MA, Surmacz E: Tamoxifen interferes with the insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1-R) signaling pathway in breast cancer cells. *Cancer Res* 1997, 57 (13), S.2606-2010
41. Hampl (1997): Hampl M, Chang-Claude J, Schwarz P, Saeger HD, Schackert HK: Molekulargenetik des hereditären Mammakarzinoms. *Zentralblatt für Chirurgie* 1997, 122, S.67-73

42. Hankinson (1998): Hankinson SE, Willett WC, Colditz GA, Hunter DJ, Michaud DS, Derroo B, Rosner B, Speizer FE, Pollak M: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-1 and risk of breast cancer. *Lancet* 1998, 351, S.1393-1396
43. Harris (1997): Harris AL: Antiangiogenesis for cancer therapy. *Lancet* 1997, 349, S.13-15
44. Harstrick (2000): Harstrick A, Perschl A: Tumorangiogenese - Therapiekonzepte. *Onkologie* 2000, 6, S.443-449
45. Heits (1997): Heits F, Katschinski DM, Wiedemann GJ, Weiss C, Jelkmann W: Serum vascular endothelial growth factor, a prognostic indicator in sarcoma and carcinoma patients. *Int J Oncol* 1997, 10, S.333-337
46. Heits (1998): Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W: Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF stimuliert die Angiogenese im Guten wie im Bösen. *Dtsch med Wschr* 1998, 123, S.259-265
47. Herbstritt (1994): Herbstritt L: Untersuchungen zur Bedeutung des EGF-Rezeptor/TGF α -Systems und von VEGF für Proliferation und Angiogenese humaner Tumoren. Inaugural-Dissertation, Freiburg, 1994
48. Houck (1991): Houck KA, Ferrara N, Winer J, Chachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991, 5 (12), S.1806-1814
49. Huynh (1996): Huynh HT, Nickerson T, Pollak M, Yang XF: Regulation of insulin-like growth factor-1 receptor gene expression by the pure antioestrogen ICI 182780. *Clin Cancer Res* 1996, 2, S.2037-2042
50. Hyder (1998): Hyder SM, Murthy L, Stancel GM: Progesterone regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1998, 58, S.392-395
51. Janssen (1999): Janssen JAMJL, Lamberts SWJ: Is the measurement of free IGF-1 more indicative than that of total IGF-1 in the evaluation of the biological activity of the GH/IGF-1 axis? *J Endocrinol Invest* 1999, 22, S.313-315
52. Jones (1995): Jones JL, Doerr ME, Clemmons DR: Cell Migration: Interactions among integrins, IGFs and IGFBPs. *Progress in Growth Factor Res* 1995, vol.6, Nos.2-4, 319-327
53. Juul (1994 [a]): Juul A, Bang P, Hertel NT, Main K, Dalgaard P, Jorgensen K, Muller J, Hall K, Skakkebaek NE: Serum insulin-like growth factor-1 in 1030 healthy children, adolescents and adults: relation to age, sex, stage of puberty, testicular size, and body mass index. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 78 (3), S.744-752
54. Juul (1994 [b]): Juul A, Main K, Blum WF, Lindholm J, Ranke MB, Skakkebaek NE: The ratio between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-1 and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2, and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients. *Clin Endocrinol Oxf* 1994, 41 (1), S.85-93
55. Juul (1997 [a]): Juul A, Scheike T, Pedersen AT, Main KM, Anderson AM, Pedersen LM, Skakkebaek NE: Changes in serum concentrations of growth

- hormone, insulin, insulin-like growth factor and insulin-like growth factor-binding proteins 1 and 3 and urinary growth hormone excretion during the menstrual cycle. *Human Reproduction* 1997, 12, S.2123-2128
56. Juul (1997 [b]): Juul A, Holm K, Kastrup KW, Pedersen SA, Michaelsen KF, Scheike T, Rasmussen S, Muller J, Skakkebaek NE: Free Insulin-like growth factor-1 serum levels in 1430 healthy children and adults, and its diagnostic value in patients suspected of growth hormone deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1997, 82 (8), S.2497-2502
57. Kiechle (2001): Kiechle M, Schmutzler R: Präventive Strategien bei familiärer Brustkrebsprädisposition. *Der Radiologe* 2001, 41, S.366-370
58. Kondo (1993): Kondo S, Asano M, Suzuki H: Significance of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem Biophys Res Commun* 1993, 194 (3), S.1234-1241
59. Kranz (1999): Kranz A, Mattfeld T, Waltenberger J: Molecular mediators of tumor angiogenesis: enhanced expression and activation of vascular endothelial growth factor receptor KDR in primary breast cancer. *Int J Cancer* 1999, 84, S.293-298
60. Kroll (2000): Kroll J, Waltenberger J: Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 2000, 89, S.206-218
61. Langston (1996): Langston AA, Malone KE, Thompson JD, Daling JR, Ostrander EA: BRCA 1 Mutations in a population-based sample of young women with breast cancer. *N Engl J Med* 1996, 334 (3), S.137-142
62. Lee (2000): Lee JK, Hong YJ, Han CJ, Hwang DY, Hong SI: Clinical usefulness of serum and plasma vascular endothelial growth factor in cancer patients: Which is the optimal specimen? *Int J Oncol* 2000, 17, S.149-152
63. Linderholm (1998): Linderholm B, Tavelin B, Grankvist K, Henriksson R: Vascular endothelial growth factor is of high prognostic value in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1998, 16 (9), S.3121-3128
64. Locopo (1998): Locopo N, Fanelli M, Gasparini G: Clinical significance of angiogenic factors in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 52, S.159-173
65. Luo (1998): Luo JC, Toyoda M, Shibuya M: Differential inhibition of fluid accumulation and tumor growth in two mouse ascites tumors by an antivascular endothelial growth factor/permeability factor neutralizing antibody. *Cancer Res* 1998, 58, S.2594-2600
66. Malaab (1992): Malaab SA, Pollak M, Goodyer CG: Direct effects of tamoxifen on growth hormone secretion by pituitary cells in vitro. *Eur J Cancer* 1992, 28A (4-5), S.788-793
67. Marmé (1998): Marmé D, Martiny-Baron G, Dreys J, Unger C: Strategien zur Hemmung der Tumorangiogenese am Beispiel des VEGF/VEGF-Rezeptorsystems. *Forum DKG*. 1998, 13, S.364-367
68. Marshall (1997): Marshall LM, Hunter DJ, Connolly JL, Schnitt SJ, Byrne C, London SJ, Colditz GA: Risk of breast cancer associated with atypical

- hyperplasia of lobular and ductal types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1997, 6 (5), S.297-301
69. Martin (1995): Martin JL, Coverley JA, Pattison ST, Baxter RC: Insulin-like growth factor-binding protein-3 production by MCF-7 breast cancer cells: Stimulation by retinoic acid and cyclic adenosine monophosphate and differential effects of estradiol. *Endocrinology* 1995, 137, S.1219-1226
 70. McEwen (1979): McEwen BS, Davis PG, Parsons B: The brain as a target for steroid hormone action. *Ann Rev Neurosci* 1979, 2, S.65-112
 71. Melnyk (1996): Melnyk O, Shuman MA, Kim KJ: Vascular endothelial growth factor promotes tumor dissemination by a mechanism distinct from its effect on primary tumor growth. *Cancer Res* 1996, 56, S.921-924
 72. Michels (1996): Michels KB, Trichopoulos D, Robins JM, Rosner BA, Manson JE, Hunter DJ, Colditz GA, Hankinson SE, Speizer FE, Willett WC: Birthweight as a risk factor for breast cancer. *Lancet* 1996, 348 (9041), S.1542-1546
 73. Oh (1998): Oh Y: IGF-independent regulation of breast cancer growth. *Breast Cancer Res Treat* 1998, 47, S.283-293
 74. Page (1985): Page DL, Dupont WD, Rogers LW, Rados MS: Atypical hyperplastic lesions of the female breast. A long-term follow-up study. *Cancer* 1985, 55 (11), S.2698-2708
 75. Pekonen (1988): Pekonen F, Partanen S, Makinen T, Rutanen EM: Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor-1 and their relation to steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* 1988, 48 (5), S.1343-1347
 76. Peyrat (1992): Peyrat JP, Bonnetterre J: Type 1 IGF receptor in human breast diseases. *Breast Cancer Res Treat* 1992, 22, S.59-67
 77. Peyrat (1993): Peyrat JP, Bonnetterre J, Hecquet B, Vennin P, Louchez MM, Fournier C, Lefebvre J, Demaille A: Plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations in human breast cancer. *Eur J Cancer* 1993, 29 A, S.492-497
 78. Peyrat (1998): Peyrat JP, Révillion F, Bonnetterre J: Plasma insulin-like growth factor in primary breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. *British J of cancer* 1998, 77, S.1669-1671
 79. Pollak (1989): Pollak M, Tremblay G: Immunocytochemical localization of insulin-like growth factor-1 receptors in primary human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 1989, 14, S.174
 80. Pollak (1990): Pollak M, Costantino J, Polychronakos C, Blauer S, Guyda H, Redmond C, Fisher B, Margoless R: Effect of tamoxifen on serum insulin-like growth factor 1 levels in stage 1 breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst* 1990, 82, S.1693-1697
 81. Pollak (1992): Pollak M, Huynh H, Pratt S: Tamoxifen reduces serum insulin-like growth factor 1 (IGF 1). *Breast Cancer Res Treat* 1992, 22, S.91-100
 82. Pollak (1998): Pollak M: IGF-Physiology and breast cancer. *Recent Results Cancer Res* 1998, 152, S.63-69
 83. Pratt (1993): Pratt SE, Pollak MN: Estrogen and antiestrogen modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation is associated with specific

- alterations in accumulation of insulin-like growth factor-binding proteins in conditioned media. *Cancer Res* 1993, 53, S.5193-5198
84. Pratt und Pollak (1994): Pratt SE, Pollak MN: Insulin-like growth factor binding protein 3 (IGFBP-3) inhibits estrogen-stimulated breast cancer cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 198 (1), S.292-297
 85. Riede (1995): Wittekind C, Riede UN: Allgemeine und spezielle Pathologie. 4, Stuttgart, Georg Thieme, 1995, S.954-958
 86. Rohlik (1987): Rohlik QT, Adams D, Kull FC Jr.: An antibody to the receptor for insulin-like growth factor-1 inhibits the growth of MCF-7 cells in tissue culture. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 149, S.276-281
 87. Rosen (1999): Rosen CJ: Serum insulin-like growth factors and insulin-like growth factor-binding proteins: Clinical implications. *Clinical Chemistry* 1999, 48:8(B), S.1384-1390
 88. Salven (1999): Salven P, Perhoniemi V, Tykka H, Mäenpää H, Joensuu H: Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1999, 53, S.161-166
 89. Schmidt-Matthiesen (1982): Schmidt-Matthiesen W: Gynäkologie und Geburtshilfe, Stuttgart, New York, Schattauer Verlag, 1982
 90. Seidmann (1986): Seidmann H: Breast cancer goes up to 10%. *Oncol Times* 1986, 8, S.3
 91. Shweiki (1995): Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshner E: Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 1995, 92, S.768-772
 92. Sutherland (1980): Sutherland RL, Murphy LC, Foo MS, Green MD, Whybourne AM: High-affinity anti-oestrogen binding sites distinct from the oestrogen receptor. *Nature* 1980, 288, S.273-275
 93. Toi (1994): Toi M, Hoshina S, Takayanagi T, Tominaga T: Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 1994, 85, S.1045-1049
 94. Toi (1996): Toi M, Kondo S, Suzuki H, Yamamoto Y, Inada K, Imazawa T, Taniguchi T, Tominaga T: Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer* 1996, 77 (6), S.1101-1106
 95. van Dessel (1996): van Dessel T, Chandrasekhar Y, Yap OW, Lee PD, Hintz RL, Faessen GH, Braat DD, Fauser BC, Giudice LC: Serum and follicular fluid levels of insulin-like growth factor-1 (IGF-1), IGF-2, and IGF-binding protein-1 and -3 during the normal menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81 (3), S.1224-1231
 96. van Doorn (2001): van Doorn J: Insulin-like growth factor (IGF) binding proteins in health and disease, with a focus on IGFBP-3. 1. DSL Growth Factor Dialogue, Amersfoort, 19. January 2001
 97. Wang (1995): Wang HS, Lee JD, Soong YK: Serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor-binding protein-1 and -3 in women with

- regular menstrual cycles. *Fertil Steril* 1995, 63 (6), S.1204-1209
98. Wörnberg (2000): Wörnberg F, Yuen J, Holmberg L: Risk of subsequent invasive breast cancer after breast carcinoma in situ. *Lancet* 2000, 355, S.724-725
 99. Weidner (1992): Weidner N, Folkman J, Pozza F, Bevilacqua P, Allred EN, Moore DH, Meli S, Gasparini G: Tumor angiogenesis: a new significant and independent prognostic indicator in early-stage breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992, 85 (8), S.674-676
 100. Werner (2000): Werner H, Le Roith D: New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factor: implications for understanding normal growth and neoplasia. *CMLS, Cell Mol Life Sci* 2000, 57, S.932-942
 101. Yamamoto (1996): Yamamoto Y, Toi M, Kondo S, Matsumoto T, Suzuki H, Kitamura M, Tsuruta K, Taniguchi T, Okamoto A, Mori T, Yoshida M, Ikeda T, Tominaga T: Concentrations of vascular endothelial growth factor in sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res* 1996, 2, S.821-826
 102. Yu (1998): Yu H, Levesque MA, Khosravi MJ, Papanastasiou-Diamandi A, Clark GM, Diamandis EP: Insulin-like growth factor-binding protein-3 and breast cancer survival. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1998, 79, 624-628
 103. Zaccheo (1986): Zaccheo T, Ornati G, di Salle E: Antioestrogenic and antitumor properties of the new triphenylethylene derivate Toremifene in the rat. *Int Cancer Congress Budapest, Abstract* 2996, 1986
 104. Zapf (1997): Zapf J: Total and free IGF serum levels. *Eur J Endocrinol* 1997, 136, S.146-147

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. W. Lichtenegger für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Frauenklinik der Charité zu verfassen.

Herrn Dr. med. Stefan Paepke danke ich für die Hilfe bei der Ausarbeitung der Fragestellung, für die Betreuung und seine konstruktive Kritik während der Durchführung der Untersuchung und der Ausformulierung.

Für Hilfe während der Arbeit in der onkologischen Abteilung der Frauenklinik danke ich Herrn Prof. Dr. med. J.-U. Blohmer und Frau Dr. med. C. Hüttner, sowie allen Mitarbeiterinnen der Poliklinik.

Für die Hilfe bei der statistischen Auswertung möchte ich Frau Siebert danken.

Mein wichtigster Dank gilt Frau Susanne Korlach, ohne deren Mitarbeit bei der Erstellung und Auswertung der Daten alles viel schwieriger gewesen wäre und die mir durch ihr fachliches Wissen und nicht zuletzt durch ihre Liebesswürdigkeit zu jeder Zeit geholfen hat.

Außerdem danke ich meinem Mitdoktoranden Florian Götze für die nette Zusammenarbeit und die Überlassung der Daten des Normalkollektivs.

Für Hilfe und Freundschaft, die diese Zeit leicht gemacht haben, danke ich Julie, Diego, Antje und Betti.

...und meinen Eltern und Großeltern für ihre Liebe und Unterstützung.

Jana Marie Maeffert
Geb.18.09.1975 in Hamburg

Hochschulbildung:

09/2000	2.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08/98	1.Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10/97-09/2000	Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität zu Lübeck
09/97	Ärztliche Vorprüfung
10/95-09/97	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

Schulbildung:

02/93-05/95	Helene-Lange-Gymnasium, Hamburg
	Abschluss: allgemeine Hochschulreife
08/92-02/93	Westlake Girls High School, Auckland, Neuseeland
02/89-07/92	Helene-Lange-Gymnasium, Hamburg
08/86-02/89	Gesamtschule Jahnschule, Hamburg
08/82-07/86	Grundschule Turmweg, Hamburg

Eidestattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, dass die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeit darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Jana Maeffert

Berlin, den